

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND****PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 02 MAR 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

103 41 271.9

**Anmeldetag:**

08. September 2003

**Anmelder/Inhaber:**

BASF Aktiengesellschaft, 67063 Ludwigshafen/DE

**Bezeichnung:**Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden oder  
deren Vorstufen mittels gentechnisch veränderter  
Organismen der Gattung *Blakeslea*, mit dem Ver-  
fahren hergestellte Carotinoide oder deren Vorstufen  
und deren Verwendung**IPC:**

C 12 N, C 07 C

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**München, den 06. Februar 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag  
Dzierzon





**Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen mittels gentechnisch veränderter Organismen der Gattung Blakeslea, mit dem Verfahren hergestellte Carotinoide oder deren Vorstufen und deren Verwendung**

5

**Zusammenfassung**

Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen mittels gentechnisch veränderter Organismen der Gattung Blakeslea umfassend

10

- (i) Transformation mindestens einer der Zellen;
- (ii) ggf. Homokaryotisierung der aus (i) erhaltenen Zellen durch Eliminierung von Kernen in diesen Zellen, so dass mindestens eine Zelle mit nur einem Kern verbleibt, der die gewünschte genetische Veränderung aus (i) aufweist und zur Ausprägung führt,
- (iii) Selektion und Vermehrung der gentechnisch veränderten Zelle oder Zellen, und
- (iv) Isolierung des von den gentechnisch veränderten Zellen produzierten Carotinoids oder der von den gentechnischen veränderten Zellen produzierten Carotinoidvorstufe.

15

nach dem Verfahren hergestellte Carotinoide oder deren Vorstufen und deren Verwendung.

20



**Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen mittels gentechnisch veränderter Organismen der Gattung Blakeslea, mit dem Verfahren hergestellte Carotinoide oder deren Vorstufen und deren Verwendung**

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen mittels gentechnisch veränderten Organismen der Gattung Blakeslea, mit dem Verfahren hergestellte Carotinoide oder deren Vorstufen und deren Verwendung.

10

Beispielsweise ist es für die Gewinnung von Phytoen bekannt, ein Gemisch aus Carotinoiden, Vitamin E. und anderen Komponenten, welches auch Phytoen enthält aus Tomaten, Karotten oder Palmöl usw. zu extrahieren. Problematisch ist hierbei die Trennung der einzelnen Carotinoiden voneinander. So ist beispielsweise das Phytoen nach diesem Verfahren nicht in reiner Form erhältlich. Auch ist die natürlich vorkommende Menge der Carotinoiden in den Pflanzen gering.

15

Die Produktion von Carotinoiden durch verschiedene Microorganismen ist ebenfalls bekannt. So ist z. B. in der WO 00/13654 A2 offenbart ein Gemisch aus Phytoen und Phytofluoren aus Algen der Art Dunaliella sp. zu extrahieren. Auch nach diesem Verfahren ist das Phytoen nicht in reiner Form erhältlich und muss von den anderen Produkten getrennt werden. Zudem handelt es sich um gentechnisch unveränderte Algen, deren Biosynthese mittels eines hinzugefügten Inhibitors beeinflusst werden muss.

20

25

Blakeslea trispora ist als Produktionsorganismus für  $\beta$ -Carotin (Ciegler, 1965, Adv Appl Microbiol. 7:1) und Lycopin bekannt (EP 1201762, EP 1184464, WO 03/038064). Die hohen Produktivitäten für  $\beta$ -Carotin und Lycopin machen Blakeslea, insbesondere Blakeslea trispora attraktiv für die wirtschaftliche fermentative Herstellung von Carotinoiden und deren Vorstufen.

30



Insbesondere aufgrund der hohen Produktivität, die mit *Blakeslea* in der Produktion von Lycopin und  $\beta$ -Carotin erreicht werden, bietet sich dieser Organismus zur fermentativen Herstellung von Carotinoiden an.

- 5 Es ist auch von Interesse die Produktivitäten der bisher natürlicherweise produzierten Carotine und deren Vorstufen weiter zu steigern und die Herstellung weiterer Carotinoide, wie z. B. Xanthophylle zu ermöglichen, die von *Blakeslea* bisher nicht oder nur in sehr geringem Maße gebildet und isoliert werden können.

10

- Carotinoide werden Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln, Kosmetika und Arzneimitteln zugesetzt. Die Carotinoide dienen vor allem als Pigmente zur Färbung. Daneben werden die antioxidative Wirkung der Carotinoide und andere Eigenschaften dieser Substanzen genutzt. Man unterteilt
- 15 die Carotinoide in die reinen Kohlenwasserstoffe, die Carotine und die sauerstoffhaltigen Kohlenwasserstoffe, die Xanthophylle. Xanthophylle wie Canthaxanthin und Astaxanthin werden beispielsweise zur Pigmentierung von Hühneriern und Fischen eingesetzt (Britton et al. 1998, Carotinoids, Vol 3, Biosynthesis and Metabolism). Die Carotine  $\beta$ -Carotin und Lycopin werden vor allem in
- 20 der Humanernährung eingesetzt.  $\beta$ -Carotin wird beispielsweise als Getränkfarbstoff verwendet. Lycopin hat eine krankheitsvorbeugende Wirkung (Argwal und Rao, 2000, CMAJ 163:739-744; Rao und Argwal 1999, Nutrition Research 19:305-323). Die farblose Carotinoidvorstufe Phytoen kommt vor allem für Anwendungen als Antioxidans in kosmetischen, pharmazeutischen oder dermatologischen Zubereitungen in Frage.
- 25

30

Der überwiegende Teil der Carotinoide und deren Vorstufen, die als Zusatzstoffe für die oben genannten Anwendungen eingesetzt werden, wird durch chemische Synthese hergestellt. Die chemische Synthese ist technisch sehr aufwendig und verursacht hohe Herstellkosten. Fermentative Verfahren sind demgegenüber technisch verhältnismäßig einfach und basieren auf kostengünstigen Einsatzstoffen. Fermentative Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden und deren Vorstufen können dann wirtschaftlich attraktiv und wettbewerbsfähig zur chemischen Synthese sein, wenn die Produktivität der bisherigen fermentativen



Verfahren gesteigert würde oder neue Carotinoide auf Basis der bekannten Produktionsorganismen hergestellt werden könnten.

Hierzu ist eine gentechnische, d. h. gezielte genetische Veränderung von Blakeslea erforderlich. Insbesondere, wenn Xanthophylle produziert werden sollen, da diese Verbindungen natürlicherweise vom Wildtyp der Blakeslea nicht synthetisiert werden.

Z. B. zur Herstellung von Phytoen mittels Fermentation von Blakeslea trispora sind bisher zwei Methoden bekannt:

(i) Durch zufallsabhängige Mutagenese mit chemischen Agenzien wie MNNG können Mutanten erzeugt werden, in denen Phytoen nicht zu Lycopin und somit nicht weiter zu  $\beta$ -Carotin umgesetzt werden kann (Mehta und Cerdá-Olmedo, 1995, Appl. Microbiol. Biotechnol. 42:836-838).

(ii) Durch Zugabe von Inhibitoren des Enzyms Phytoendesaturase wie z.B. Diphenylamin und Zimtalkohol kann die weitere Umsetzung von Phytoen blockiert werden, so dass es sich anreichert (Cerdá-Olmedo, 1989, In: E. Vandamme, ed. Biotechnology of vitamin, growth factor and pigment production. London: Elsevier Applied Science, S. 27-42).

Die genannten Methoden zur Herstellung von Phytoen mit Blakeslea trispora weisen jedoch eine Reihe von Nachteilen auf.

Die zufallsabhängige Mutagenese betrifft in der Regel nicht nur die Gene der Carotinoidbiosynthese zur weiteren Umsetzung von Phytoen, sondern auch weitere wichtige Gene. Daher sind Wachstum und Syntheseleistung der Mutanten oft beeinträchtigt. Die Erzeugung z. B. von Phytoenüberproduzenten durch zufallsabhängige Mutagenese von Lycopinüberproduzenten oder  $\beta$ -Carotinüberproduzenten ist daher entweder nicht oder nur mit großem experimentellem Aufwand zu erreichen. Die Zugabe von Inhibitoren verursacht eine Erhöhung der Produktionskosten und gegebenenfalls eine Verunreinigung des Produktes.



Daneben kann das Zellwachstum durch den Inhibitor beeinträchtigt werden, so dass die Produktion von Carotinoiden oder deren Vorstufen, insbesondere Phytoen eingeschränkt wird.

- 5 Durch eine gentechnische Veränderung könnten die oben genannten Nachteile der zufallsabhängigen Mutagenese und der Inhibitorzugabe vermieden werden.

10 Allerdings sind bisher keine Methoden zur gentechnischen, d. h. gezielten gentechnischen Veränderung von *Blakeslea*, insbesondere *Blakeslea trispora* bekannt.

15 Als Methode zur Herstellung von gentechnisch veränderten Pilzen wurde in einigen Fällen die Agrobacterium-vermittelte Transformation erfolgreich eingesetzt. So sind z. B. folgende Organismen durch Agrobakterien transformiert worden: *Saccharomyces cerevisiae* (Bundock et al., 1995, EMBO Journal, 14:3206–3214), *Aspergillus awamori*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani pisi*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei*, *Pleurotus ostreatus*, *Fusarium graminearum* (van der Toorren et al., 1997, EP 870835), *Agraricus bisporus*, *Fusarium venenatum* (de Groot et al., 1998, Nature Biotechnol. 16:839–842), *Mycosphaerella graminicola* (Zwiers et al. 2001, Curr. Genet. 39:388–393), *Glarea lozoyensis* (Zhang et al., 2003, Mol. Gen. Genomics 268:645–655), *Mucor miehei* (Monfort et al. 2003, FEMS Microbiology Lett. 244:101 – 106).

25

Von Interesse ist besonders eine homologe Rekombination, bei der zwischen der einzuführenden DNA und der Zell-DNA möglichst viele Sequenzhomologien bestehen, so dass eine ortsspezifische Einführung bzw. Ausschaltung von genetischer Information im Genom des Empfängerorganismus möglich ist. Andernfalls wird die Spender-DNA durch illegitime bzw. nicht-homologe Rekombination ins Genom des Empfängerorganismus integriert, was nicht ortsspezifisch erfolgt.

30



Eine durch *Agrobacterium* vermittelte Transformation und anschließende homologe Rekombination der transferierten DNA wurde bisher bei folgenden Organismen nachgewiesen: *Aspergillus awamori* (Gouka et al. 1999, Nature Biotech 17:598-601), *Glarea lozoyensis* (Zhang et al., 2003, Mol. Gen. Genomics 268:645-655), *Mycosphaerella graminicola* ((Zwiers et al. 2001, Curr. Genet. 39:388-393).

Als weitere Methode zur Transformation von Pilzen ist die Elektroporation bekannt. Die integrative Transformation von Hefe durch Elektroporation wurde von Hill, Nucl. Acids. Res. 17:8011 gezeigt. Für filamentöse Pilze wurde die Transformation durch Chakaborty und Kapoor beschrieben (1990, Nucl. Acids. Res. 18:6737).

Eine „biolistische“ Methode, d.h. die Übertragung von DNA durch Beschuss von Zellen mit DNA-beladenen Partikeln wurde beispielsweise für *Trichoderma harzianum* und *Gliocladium virens* beschrieben (Lorito et al. 1993, Curr. Genet. 24:349-356).

Diese Methoden konnten bisher jedoch nicht erfolgreich zur gezielten genetischen Veränderung von *Blakeslea* und insbesondere *Blakeslea trispora* eingesetzt werden.

Eine besondere Schwierigkeit bei der Herstellung von gentechnisch veränderten *Blakeslea* und *Blakeslea trispora*, ist die Tatsache, dass deren Zellen in allen Stadien des sexuellen und des vegetativen Zellzyklus mehrkernig sind. In Sporen von *Blakeslea trispora* Stamm NRRL2456 und NRRL2457 wurden z. B. im Durchschnitt 4,5 Kerne pro Spore nachgewiesen (Metha und Cerdá-Olmedo, 1995, Appl. Microbiol. Biotechnol. 42:836-838). Dies hat zur Folge, dass die gentechnische Veränderung in aller Regel nur in einem oder wenigen Kernen vorliegt, die Zellen also heterokaryotisch sind.



Sollen die genetisch veränderten *Blakeslea*, insbesondere *Blakeslea trispora* zur Produktion eingesetzt werden, so ist es insbesondere bei einer Gendelektion wichtig, dass in den Produktionsstämmen die gentechnische Veränderung in allen Kernen vorliegt, so dass eine stabile und hohe Syntheseleistung ohne Nebenprodukte möglich wird. Die Stämme müssen folglich in Bezug auf die gentechnische Veränderung homokaryotisch sein.

Lediglich für *Phycomyces blakesleeanus* ist ein Verfahren beschrieben worden, um homokaryotische Zellen zu erzeugen (Roncero et al., 1984, Mutat. Res. 125:195). Durch Zugabe des mutagenen Agens MNNG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin) werden nach dem dort beschriebenen Verfahren Kerne in den Zellen eliminiert, so dass statistisch eine gewisse Anzahl von Zellen mit nur noch einem funktionellem Kern vorliegt. Die Zellen werden dann einer Selektion unterzogen, in der nur einkernige Zellen mit einem rezessiven Selektionsmarker zu einem Mycel auswachsen können. Die Nachkommen dieser selektierten Zellen sind mehrkernig und homokaryotisch. Ein rezessiver Selektionsmarker für *Phycomyces blakesleeanus* ist z. B. *dar*<sup>+</sup>-Stämme nehmen das toxische Riboflavin-Analog 5-Carbon-5-deazariboflavin auf; *dar*<sup>-</sup>-Stämme dagegen nicht (Delbrück et al. 1979, Genetics 92:27). Die Selektion von rezessiven Mutanten erfolgt durch Zugabe von 5-Carbon-5-deazariboflavin (DARF).

Allerdings ist dieses Verfahren nicht für *Blakeslea*, insbesondere *Blakeslea trispora* bekannt und insbesondere nicht mit im Zusammenhang mit einer Transformation oder der Produktion von Carotinoiden oder deren Vorstufen beschrieben worden.

Aufgabe der Erfindung ist es gentechnisch veränderte Zellen von *Blakeslea*-Stämmen, insbesondere *Blakeslea trispora* bereitzustellen, die Carotinoide oder deren Vorstufen, insbesondere Phytoen produzieren. Zudem soll das Verfahren die Steigerung der Carotinoid-Produktivität der veränderten Zellen gegenüber den korrespondierenden Wildtypen erlauben. Ferner soll das Verfahren die Erzeugung neuer Zellen oder aus ihnen bestehendes Mycel erlauben, die sich für die Verwendung zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen eignen, die bisher nicht in wirtschaftlich interessanten Mengen aus den natürlich vor-



7.  
kommenden Pilzen gewinnbar waren, insbesondere Xanthophylle und Phytoen.  
Das Verfahren soll dabei eine gentechnische Veränderung von Blakeslea-  
Stämmen, insbesondere Blakeslea trispora möglich machen und die Herstel-  
lung homokaryotischer gentechnisch veränderter Produktions-Stämme erlau-  
ben.

5  
Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden oder  
deren Vorstufen mittels gentechnisch veränderten Organismen der Gattung  
Blakeslea gelöst, umfassend

- 10 (i) Transformation mindestens einer der Zellen,
- (ii) ggf. Homokaryotisierung der aus (i) erhaltenen Zellen durch Eliminie-  
rung von Kernen in diesen Zellen, so dass mindestens eine Zelle mit  
nur einem Kern verbleibt, der die gewünschte genetische Veränderung  
aus (i) aufweist und zur Ausprägung führt,
- 15 (iii) Selektion und Vermehrung der gentechnisch veränderten Zelle oder  
Zellen, und
- (iv) Isolierung des von den gentechnisch veränderten Zellen produzierten  
Carotinoids oder der von den gentechnischen veränderten Zellen pro-  
duzierten Carotinoidvorstufe.

20 Mit der erfindungsgemäßen Methode ist es möglich, Blakeslea gezielt und stabil  
genetisch zu verändern, um so Mycel aus Zellen mit einheitlichen Kernen zu  
gewinnen, das Carotinoide oder deren Vorstufen, insbesondere Phytoen produ-  
ziert. Vorzugsweise handelt es sich um Zellen von Pilzen der Art Blakeslea  
25 trispora. Die produzierten Carotinoiden oder deren Vorstufen sind dabei im we-  
sentlichen frei von Verunreinigungen erhältlich und es können hohe Konzentra-  
tionen der Carotinoiden oder deren Vorstufen im Kulturmedium erzielt werden.

30 Unter Transformation wird die Übertragung einer genetischen Information in  
den Organismus, insbesondere Pilz verstanden. Darunter sollen alle dem  
Fachmann bekannten Möglichkeiten zur Einschleusung der Information, insbe-



M

sondere DNA fallen, z. B. Beschuss mit DNA-beladenen Partikeln, Transformation mittels Protoplasten, Mikroinjektion von DNA, Elektroporation, Konjugation oder Transformation kompetenter Zellen, Chemikalien oder Agrobakterien vermittelte Transformation. Als genetische Information werden ein Genabschnitt, ein Gen oder mehrere Gene verstanden. Die genetische Information kann z. B. mit Hilfe eines Vectors oder als freie Nukleinsäure (z. B. DNA, RNA) und auf sonstige Weise in die Zellen eingebracht und entweder durch Rekombination ins Wirtsgenom eingebaut oder in freier Form in der Zelle vorliegen. Besonders bevorzugt ist hierbei die homologe Rekombination.

Bevorzugte Transformationsmethode ist die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation. Hierzu wird zunächst die zu transferierende Spender-DNA in einen Vektor eingefügt, der (i) flankierend zu der zu transferierenden DNA die T-DNA-Enden trägt, der (ii) einen Selektionsmarker enthält und der (iii) ggf. Promotoren und Terminatoren für die Genexpression der Spender-DNA aufweist. Dieser Vektor wird in einen *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm übertragen, der ein Ti-Plasmid mit den *vir*-Genen enthält. *vir*-Gene sind für den DNA-Transfer in *Blakeslea* verantwortlich. Mit diesem Zwei-Vektor-System wird die DNA von *Agrobacterium* in *Blakeslea* übertragen. Hierzu werden die *Agrobakterien* zunächst in Gegenwart von Acetosyringone inkubiert. Acetosyringone induziert die *vir*-Gene. Anschließend werden Sporen von *Blakeslea trispora* zusammen mit den induzierten Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* auf Acetosyringone-haltigem Medium inkubiert und dann auf Medium übertragen, das eine Selektion der Transformanten, d.h. der gentechnisch veränderten Stämme von *Blakeslea* ermöglicht.

Der Begriff Vector wird in der vorliegenden Anmeldung als eine Bezeichnung für ein DNA-Molekül verwendet, das zum Einschleusen und ggf. zur Vermehrung von Fremd-DNA in eine Zelle dient (siehe auch "Vector" in Römpp Lexikon Chemie – CDROM Version 2.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1999). In der vorliegenden Anmeldung sollen unter dem Begriff "Vector" auch Plasmide, Cosmide usw. verstanden werden, die dem gleichen Zweck dienen.



Unter Expression wird in der vorliegenden Anmeldung die Übertragung einer genetischen Information ausgehend von DNA oder RNA in ein Gen-Produkt (hier vorzugsweise Enzyme zur Herstellung von Carotinoiden und insbesondere Phytoen) verstanden und soll auch den Begriff der Überexpression beinhalten, womit eine verstärkte Expression gemeint ist, so dass ein bereits in der nicht transformierten Zelle (Wildtyp) hergestelltes Genprodukt verstärkt produziert wird oder einen großen Teil des gesamten Gehaltes der Zelle ausmacht.

Unter gentechnische Veränderung soll die Einschleusung genetischer Information in einen Empfängerorganismus, so dass diese stabil exprimiert und bei der Zellteilung weitergegeben wird, verstanden werden. In diesem Zusammenhang ist die Homokaryotisierung, die Herstellung von Zellen, die nur einheitliche Kerne enthalten, d. h. Kerne mit gleichem genetischem Informationsgehalt.

Diese Homokaryotisierung ist nur notwendig, wenn die durch Transformation eingeführte genetische Information rezessiv vorliegt, d. h. nicht zur Ausprägung gelangt. Führt die Transformation aber zu einem dominanten Vorliegen der genetischen Information, d. h. wird sie ausgeprägt, so ist eine Homokaryotisierung nicht unbedingt nötig. Vorzugsweise wird zur Homokaryontisierung ein mutagenes Agens eingesetzt, wobei es sich insbesondere um N-Methyl-N'-nitro-nitrosoguanidin (MNNG) handelt.

Unter Selektion wird die Auswahl von Zellen verstanden, deren Kerne dieselbe genetische Information beinhalten, d. h. Zellen die die gleichen Eigenschaften aufweisen, wie Resistenzen oder die Herstellung bzw. vermehrte Herstellung eines Produktes. In der Selektion werden bevorzugt 5-Carbon-5-deazariboflavin (darf) und Hygromycin (hyg) eingesetzt.

Der in der Transformation (i) eingesetzte Vector kann derart gestaltet sein, dass die im Vector enthaltene genetische Information in das Genom mindestens einer Zelle integriert wird. Dabei kann genetische Information in der Zelle ausgeschaltet werden. Dies kann direkt, d. h. durch eine Deletion erfolgen. Es ist aber auch möglich, daß der in der Transformation (i) eingesetzte Vector derart ausgestaltet ist, dass die im Vector enthaltene genetische Information in der Zelle exprimiert wird, d. h. genetische Information eingefügt wird, die im



exprimiert wird, d. h. genetische Information eingefügt wird, die im korrespondierenden Wildtyp nicht vorhanden ist oder die durch die Transformation verstärkt bzw. überexprimiert wird und deren Produkt das Gen ausschaltet. Die eingeführte genetische Information kann aber auch indirekt eine genetische Information in der Zelle ausschalten, z. B. durch Produktion eines Inhibitors.

Der eingesetzte Vector enthält genetische Informationen oder Teile der genetischen Information zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen, insbesondere Carotinen oder Xanthophyllen oder deren Vorstufen. Der eingesetzte Vector enthält vorzugsweise genetische Informationen zur Herstellung von Astaxanthin, Zeaxanthin, Echinenon,  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\beta$ -Carotin, Andonixanthin, Adonirubin, Canthaxanthin, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Lycopin, Lutein oder Phytoen. Ganz besonders bevorzugt enthält der Vector Informationen zur Herstellung von Phytoen, Astaxanthin oder Zeaxanthin.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Organismen der Gattung Blakeslea beispielsweise dadurch in die Lage versetzt Xanthophylle, wie beispielsweise Canthaxanthin, Zeaxanthin oder Astaxanthin herzustellen, indem in den genetisch veränderten Organismen der Gattung Blakeslea im Vergleich zum Wildtyp eine Hydroxylase-Aktivität und/oder Ketolase-Aktivität verursacht wird.

Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.



Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

- 5 Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß der entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangsorganismus der Gattung *Blakesleaa* verstanden.

10 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Organismus" der Ausgangsorganismus (Wildtyp) der Gattung *Blakesleaa* oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Organismus der Gattung *Blakesleaa* oder beides verstanden werden.

15 Vorzugsweise wird unter "Wildtyp" für die Verursachung der Ketolase-Aktivität und für die Verursachung der Hydroxylase-Aktivität jeweils eine Referenz Organismus verstanden.

Diese Referenzorganismus der Gattung *Blakesleaa* ist *Blakeslea trispora* ATCC 14271.

- 20 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen der Gattung *Blakesleaa* und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

25 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Organismen der Gattung *Blakeslea* erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in Extrakten wird mit den Substraten beta-Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

30

Der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus der Gattung *Blakesleaa* weist in dieser, bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, transgen eine Ketolase zu exprimieren.



In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Ketolase-Aktivität in den Organismen der Gattung *Blakesleaa* durch Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase.

In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren in die Ausgangsorganismus der Gattung *Blakesleaa*.

Dazu kann prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Ketolase codiert verwendet werden.

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das der Wirtsorganismus der Gattung *Blakesleaa* nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Ketolasen, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können sind beispielsweise Sequenzen aus:

*Haematoccus pluvialis*, insbesondere aus *Haematoccus pluvialis* Flotow em. Wille (Accession NO: X86782; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 18, Protein SEQ ID NO: 19),

*Haematoccus pluvialis*, NIES-144 (Accession NO: D45881; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 20, Protein SEQ ID NO: 21),



*Agrobacterium aurantiacum* (Accession NO: D58420; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 22, Protein SEQ ID NO: 23),

5 *Alicagenes spec.* (Accession NO: D58422; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 24, Protein SEQ ID NO: 25),

*Paracoccus marcusii* (Accession NO: Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 26, Protein SEQ ID NO: 27).

10 *Synechocystis sp.* Strain PC6803 (Accession NO: NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 28, Protein SEQ ID NO: 29).

*Bradyrhizobium sp.* (Accession NO: AF218415; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 30, Protein SEQ ID NO: 31).

15

*Nostoc sp.* Strain PCC7120 (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 32, Protein SEQ ID NO: 33),

20

*Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000195; Basenpaar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 34); Protein: Acc.-No. ZP\_00111258 (SEQ ID NO: 35) (als putatives Protein annotiert),

25

*Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 36), Protein: (SEQ ID NO: 37) (nicht annotiert),

30

Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit den Sequenzen SEQ ID NO: 19 und/oder 33 leicht auffinden.



Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 19 und/oder 33 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.



Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrift sind in-  
folge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

- 5 (i) 4X SSC bei 65°C, oder
- (ii) 6X SSC bei 45°C, oder
- (iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder
- (iv) 6X SSC, 0,5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder
- 10 (v) 6XSSC, 0,5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- (vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder
- (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0,1 % Rinderserumalbumin, 0,1 % Ficoll, 0,1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5, 750 mM NaCl, 75
- 15 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder
- (viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder
- (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (moderate Bedingungen).

20 (2) Waschschriffe für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel

- (i) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C, oder
- (ii) 0,1X SSC bei 65°C, oder
- (iii) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C, oder
- (iv) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- 25 (v) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C, oder
- (vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen genetisch ver-  
änderten Organismen der Gattung *Blakeslea* bringt man Nukleinsäuren ein, die  
30 ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 19 oder  
eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Amino-  
säuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugs-  
weise mindestens 30%, bevorzugter mindestens 40%, bevorzugter mindestens  
50%, bevorzugter mindestens 60%, bevorzugter mindestens 70%, bevorzugter



mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 19 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

- 5     Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 19 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren
- 10     abgewandelt wurde.

- 15     In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 33 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30%, bevorzugter mindestens 40%, bevorzugter mindestens 50%, bevorzugter mindestens 60%, bevorzugter mindestens 70%, bevorzugter mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO:
- 20     33 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

- 25     Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 33 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

- 30     Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.



Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

5

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

10

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

15

Multiple alignment parameter:

Gap penalty 10

Gap length penalty 10

20

Pairwise alignment parameter:

K-tuple 1

Gap penalty 3

Window 5

Diagonals saved 5

25

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 19 oder 33 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 19 oder 33, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

30



Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Blakesleaspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene von Organismen der Gattung Blakeslea leicht ermitteln.

10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 18 in die Organismus der Gattung ein.

15 In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 32 in die Organismus der Gattung ein.

20 Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. 25 (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

30 Unter Hydroxylase-Aktivität die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.



Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter Hydroxyase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

- 10 Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

- 15 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

- 20 Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. ReferenzOrganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 25 Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Organismenextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie beta-Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

- 30 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):



Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Organismenextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 250 µl Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Organismenextrakt, 20 nM Lycopin, 250 µg an chromoplastidärem Stroma-protein aus Paprika, 0.2 mM NADP+, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase gegenüber dem Wild-



typ.

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase in denb Organismus der Gattung Blakesleaa.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase in den Organismus der Gattung Blakesleaa.

15 Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine  $\beta$ -Cyclase codiert, verwendet werden.

20 Bei genomischen Hydroxylase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das der WirtsOrganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

25 Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus Haematococcus pluvialis, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 38, Protein: SEQ ID NO: 39).

30 sowie Hydroxylasen der folgenden Accession Nummern:  
|emb|CAB55626.1, CAA70427.1, CAA70888.1, CAB55625.1, AF499108\_1, AF315289\_1, AF296158\_1, AAC49443.1, NP\_194300.1, NP\_200070.1, AAG10430.1, CAC06712.1, AAM88619.1, CAC95130.1, AAL80006.1, AF162276\_1, AAO53295.1, AAN85601.1, CRTZ\_ERWHE, CRTZ\_PANAN, BAB79605.1, CRTZ\_ALCSP, CRTZ\_AGRAU, CAB56060.1, ZP\_00094836.1,



AAC44852.1, BAC77670.1, NP\_745389.1, NP\_344225.1, NP\_849490.1,  
ZP\_00087019.1, NP\_503072.1, NP\_852012.1, NP\_115929.1, ZP\_00013255.1

5 In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Organismen der Gattung  
Blakeslea liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem  
Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen vor.

10 In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Orga-  
nismus beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine  
Hydroxylase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine  
Hydroxylase auf.

15 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausfüh-  
rungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthal-  
tend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 39 oder eine von dieser Sequenz  
durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Se-  
quenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %,   
bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevor-  
zugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID.  
20 NO: 39, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

25 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich bei-  
spielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz be-  
kannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Amino-  
säuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäurese-  
quenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO: 39 leicht auffinden.

30 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiter-  
hin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 38 aus verschiede-  
nen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorste-  
hend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich be-  
kannter Weise leicht auffinden.



In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 39.

5

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

10

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

15

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 38 in den Organismus ein.

20

Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und

25

Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

30

Vorzugsweise wird durch die Transformation das Gen der Phytoendesaturase ausgeschaltet.



Der in der Transformation (i) eingesetzte Vector enthält vorzugsweise den *gpd* Promotor und/oder den *trpC* Terminator. Diese haben sich zur Transformation der *Blakeslea* besonders bewährt.

5. Vorteilhafterweise weist der im Vector eingesetzte *gpd* Promotor die Sequenz SEQ. ID. NO:1 auf. Vorteilhafterweise weist der im Vector eingesetzte *trpC* Terminator die Sequenz SEQ. ID. NO:2 auf.

10 Insbesondere werden dabei der *gpd* Promotor und der *trpC* Terminator aus *Aspergillus nidulans* eingesetzt.

Insbesondere enthält der in der Transformation (i) eingesetzte Vector ein Resistenzgen. Bevorzugterweise handelt es sich um ein Hygromycin-Resistenzgen (*hph*), insbesondere das aus *E. coli*. Dieses Resistenzgen hat sich bei dem  
15 Nachweis der Transformation und Selektion der Zellen als besonders geeignet herausgestellt.

Als Promotor für *hph* wird also bevorzugt *p-gpdA*, der Promotor der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase aus *Aspergillus nidulans* genutzt. Als Terminator für *hph* wird bevorzugt *t-trpC*, der Terminator des Gens *trpC*, codierend für Anthranilatsynthasekomponenten aus *Aspergillus nidulans* genutzt.  
20

Der Vector kann beispielsweise die SEQ. ID. NO: 3 aufweisen.

- 25 Die gentechnisch veränderten Organismen können zur Produktion von Carotinoiden oder deren Vorstufen, insbesondere Phytoen verwendet werden. Auch können neue, im Wildtyp natürlicherweise nicht vorkommende Carotinoide durch Einbringung der entsprechenden genetischen Information von den gezielt genetisch veränderten Zellen bzw. dem durch sie gebildeten Mycel erzeugt und  
30 anschließend isoliert werden.

Zur Insertionsmutagenese trägt die transferierte DNA beispielsweise ein Fragment von *carB*, das Gen der Phytoendesaturase aus *Blakeslea trispora*. Die Insertionsmutagenese und Inaktivierung von *carB* in *Blakeslea trispora* erfolgen



durch homologe Rekombination. Es schließt sich eine Selektion auf homokaryotische Mutanten an, deren *carB* durch die Insertionsmutagenese inaktiviert ist. Die selektierten und vermehrten gezielt genetisch veränderten Zellen können daher Phytoen im Gegensatz zum Wildtyp nicht zu Lycopin und  $\beta$ -Carotin umsetzen und erlauben folglich die Produktion und Gewinnung von Phytoen.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Carotinoiden oder deren Vorstufen, insbesondere Phytoen eignen sich besonders zur Herstellung von Zusätzen für Futter-, Nahrungs- und Nahrungsergänzungsmittel, kosmetischen, pharmazeutischen oder dermatologischen Zubereitungen.

Die Erfindung wird nachfolgend an Hand von Beispielen näher ausgeführt.

#### Beispiele

Molekulargenetische Arbeiten wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach den Methoden in Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1999, John Wiley & Sons) durchgeführt.

#### Stämme und Wachstumsbedingungen

Der *Blakeslea trispora* Stamm ATCC14272 (-) (ein Wildtyp) wurde erhalten von der American Type Culture Collection. Die Anzucht von *B. trispora* erfolgte in MEP-Medium (Malzextrakt-Pepton-Medium): 30 g/l Malzextrakt (Difco), 3 g/l Pepton (Soytone, Difco), Einstellung pH 5,5, ad 1000 ml mit H<sub>2</sub>O bei 28 °C. Für feste Medien wurde 20 g/l Agar zugegeben.

Für die Klonierung und Vermehrung von Plasmiden, sowie zur Enzymproduktion und dem Nachweis der Enzymaktivität wurde *Escherichia coli* XL1-Blue (Fa. Stratagene) eingesetzt. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl ad 1000 ml mit H<sub>2</sub>O bei 28 °C oder bei 37 °C. Den Kulturen wurde nach Bedarf Ampicillin (100 µg/ml), Tetracyclin (12 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml), 50 µg/ml Kanamycin, 50 µl der IPTG-Stammlösung (24 mg/ml H<sub>2</sub>O) pro Agarplatte, 50 µl der X-Gal-Stammlösung (20 mg/ml N,N'-Dimethylformamid pro Agarplatte, Rhamnose 2% (w/v) zugegeben.



Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 erfolgte nach Hoekema et al. (1983, Nature 303:179-180) bei 28 °C für 24 h in Agrobacterien-Minimal Medium (AMM): 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Glucose, MM-Salze (2,5 mM NaCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 700 µM CaCl<sub>2</sub>, 9 µM FeSO<sub>4</sub>, 4 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

5

#### Plasmide

Zur Klonierung für die DNA-Sequenzanalyse wurde der Vektor pPCR-Script Amp SK(+) eingesetzt (Fa. Stratagene).

10

Zur Expression von *carB* wurde der Vektor pJOE2702 eingesetzt (Biospektrum 2000, 1:33-36) eingesetzt. Das gebildete Plasmid wurde pBT4 genannt. Für den Nachweis der Enzymaktivität des Proteins CarB wurde pBT4 zusammen mit pCAR-AE (J. Bac. 1990, 172:6704-6712) in *Escherichia coli* XL-1 Blue kloniert. Klone mit pCAR-AE bilden Phytoen. Klone mit pCAR-AE und pBT4 bilden Lycopin.

15

Für die Deletion von *carB* in *Blakeslea trispora* wurde der Vektor pBinAHygΔ-*carB* (SEQ. ID. NO:3, Fig. 3) konstruiert. Der Vorläufer von pBinAHygΔ*carB* ist pBinAHyg (SEQ. ID. NO:4, Fig. 2). pBinAHyg wurde folgendermaßen konstruiert:

20

Aus dem Plasmid pANsCos1 (SEQ. ID. NO:5, Fig. 1, Osiewacz, 1994, Curr. Genet. 26:87-90) wurde die *gpdA*-*hph* Kassette als BglII/HindIII Fragment isoliert und in das BamHI/HindIII geöffnete binäre Plasmid pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12:8711-8721) ligiert. Der so erhaltene Vektor wurde als pBinAHyg bezeichnet und enthält das *E. coli* Hygromycin-Resistenzgen (*hph*) unter Kontrolle des *gpd* Promotors und des *trpC* Terminators aus *Aspergillus nidulans* sowie die entsprechenden Bordersequenzen, die für den DNA-Transfer von *Agrobacterium* notwendig sind.

25

#### 30 Präparation von Nukleinsäuren

Genomische DNA von *Blakeslea trispora* wurde mit dem DNAeasy Plant Maxi Kit, der Fa. Qiagen präpariert. DNA für die Klonierung wurde nach Gelelektrophorese in E-Gel Pre-Cast Agarose Gels (Fa. Invitrogen) durch das GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Fa. Amersham Biosciences) gereinigt.



Die Präparation von DNA-freier RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Plant Minikit und des RNase-Free DNase Set, der Fa. Qiagen.

### **Polymerase-Kettenreaktion**

- 5 Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden mit dem GeneAmpPCR System 9600 (Fa. Perkin Eimer Cetus) durchgeführt. Für die PCR wurden die Enzyme Pfu-Polymerase und Herculanase (Fa. Stratagene) eingesetzt. Zur Kontrolle der DNA-Sequenz wurden PCR-Fragmente nach Amplifikation der chromosomalen DNA direkt mehrfach sequenziert.

10

### **cDNA-Synthese und Amplifikation der cDNA-Kopien**

- Für die cDNA-Synthese wurde das Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis, der Fa. Gibco BRL verwendet. Zur cDNA-Synthese wurden 5 µg Gesamt-RNA aus *Blakeslea trispora* eingesetzt. Die RNA wurde in 11 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und anschließend mit 1 µl oligo(dT)-Lösung vermischt, 10 min. bei 70°C und anschließend 1 min. auf Eis inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 2 µl 10x synthesis buffer, 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl 10 mM dNTP Mix, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl SuperScript H (200 U/µl). Die Reaktionsansätze wurden 10 min. bei Raumtemperatur, 50 min. bei 42 °C und 15 min. bei 72 °C inkubiert, dann auf Eis gestellt, mit 1 µl RNaseH versetzt und 20 min. bei 37°C inkubiert. Von der erhaltenen cDNA wurde 1 µl in 100 µl PCR-Ansätzen eingesetzt.

20

### **DNA-Sequenzierung**

- 25 Die DNA-Sequenzierung der PCR-Fragmente und der Plasmide erfolgte nach der Methode des cycle sequencing mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, der Fa. Applied Biosystems: 500 ng Plasmid DNA oder 0.1 pmol PCR-Produkt, 4 µl BDT v3.1, 1 µl DMSO, 1 µl Primer (im Überschuß jedoch mindestens 10pmol), ad 20µl H<sub>2</sub>O (Endvolumen). Temperaturprofil: 1) 95°C, 40 s, 2) 95°C, 20 s, 3) 50°C, 20 s, 4) 45-60°C, 90 s, 5) 60°C, 5 min; Zyklenzahl: 1) 1x; 2-4) 35x, 5) 1x. Nach Dye Terminator Abreinigung und Probenvorbereitung erfolgte die Gelelektrophorese im ABI Prism DNA Sequencer 377, der Fa. Applied Biosystems.

30



### DNA-Sequenzanalyse

Für die DNA-Sequenzanalyse wurden die Programme GAP und BESTFIT eingesetzt. Das Programm GAP führt einen Sequenzvergleich (Alignment) durch, um die maximale Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen nach der Methode von Needleman und Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443-453) zu finden. Das Programm BESTFIT führt ein optimales Alignment des Segmentes mit der besten Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen. Das Programm BESTFIT nutzt den "local homology algorithm" von Smith und Waterman (Advances in Applied Mathematics 2:482-489).

### Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Das Plasmid pBinAHyg und dessen Abkömmlinge (z. B. pBinAHyg $\Delta$ carB) wurden in den Agrobakterienstamm LBA 4404 (Hoekema et al., 1983, Nature 303:179-180) elektroporiert (Mozo and Hooykaas, 1991, Plant Mol. Biol. 16:917-918). Zur Selektion wurden bei der Agrobakterienanzucht folgende Antibiotika verwendet: Rifampicin 50 mg/l (Selektion auf das *A. tumefaciens* Chromosom), Streptomycin 30 mg/l (Selektion auf das Helferplasmid) und Kanamycin 100 mg/l (Selektion auf den binären Vektor).

### Transformation von *Blakeslea trispora*

Zur Transformation wurden die Agrobakterien nach 24 h Anzucht in AMM auf eine OD<sub>600</sub> von 0,15 in Induktionsmedium (IM: MM-Salze, 40 mM MES (pH 5,6), 5 mM Glucose, 2 mM Phosphat, 0,5% Glycerol, 200  $\mu$ M Acetosyringone) verdünnt und erneut über Nacht in IM bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 angezogen.

Zur Co-Inkubation von *Blakeslea* und *Agrobacterium* wurden 100  $\mu$ l Agrobaktériensuspension mit 100  $\mu$ l *Blakeslea* Sporensuspension ( $10^7$  Sporen/ml in 0,9% NaCl) gemischt und steril auf einer Nylon Membran (Hybond N, Amersham) auf IM-Agarose Platten (IM + 18 g/l Agar) verteilt. Nach 3 Tagen Inkubation bei 26 °C wurde die Membran auf eine MEP-Agarplatte (30 g/l Malzextrakt, 3 g/l Pepton, pH 5,5, 18 g/l Agar) überführt. Zur Selektion auf transformierte *Blakeslea*-zellen enthielt das Medium Hygromycin in einer Konzentration von 100 mg/l sowie zur Selektion gegen Agrobakterien 100 mg/l Cefotaxim. Die Inkubation erfolgte für ca. 7 Tage bei 26 °C. Anschließend erfolgte der Transfer von Mycel



auf frische Selektionsplatten. Gebildete Sporen wurden mit 0,9% NaCl abgespült und auf CM17-1-Agar (3 g/l Glucose, 200 mg/l L-Asparagin, 50 mg/l  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 150 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25  $\mu\text{g/l}$  ThiaminHCl, 100 mg/l Yeast Extract, 100 mg/l Na-desoxycholat, pH 5,5, 18 g/l Agar) ausplattiert.

5

### Mutagenese mit MNNG

Zur Reduzierung der Anzahl von Kernen pro Spore wurde eine Behandlung von Sporensuspensionen mit MNNG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine Sporensuspension mit  $1 \times 10^7$  Sporen/ml in Tris/HCl-Puffer, pH 7,0 hergestellt. Der Sporensuspension wurde MNNG in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben. Die Zeit der Inkubation in MNNG wurde so gewählt, dass die Überlebensrate der Sporen ca. 5% betrug. Nach Inkubation mit MNNG wurden die Sporen dreimal mit 1g/l Span 20 in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und plattiert.

15

### Selektion homonukleater Zellen

Die Selektion homonukleater Zellen von *Blakeslea trispora carB<sup>-</sup>* erfolgte analog zum Versuchsprotokoll für *Phycomyces blakesleeanus* (Roncero et al., 1984, Mutation Research, 125:195-204), modifiziert durch Wachstum in Gegenwart von 5-Carbon-5-Deazariboflavin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und Hygromycin 100 ( $\mu\text{g/ml}$ ).

20

### Klonierung und Sequenzanalyse carB

(carB = Gen der Phytoendesaturase aus *Blakeslea trispora*,)

Aus dem Sequenzvergleich der Peptidsequenzen von Phytoendesaturasen und dem Vergleich der zugehörigen DNA-Sequenzen von *Phycomyces blakesleeanus*, *Cercospora nicotianae*, *Phaffia rhodozyma* und *Neurospora crassa* wurden die degenerierten Primer MAT182 5'-GCNGARGGGNATHTGGTA-3' (SEQ. ID. NO:6) und MAT192 5'-TCNGCNAGRAADATRTTTRTG-3' (SEQ. ID. NO:7) abgeleitet. Die PCR wurde in 100  $\mu\text{l}$  Ansätzen durchgeführt. Diese enthielten 200 ng genomische DNA von *Blakeslea trispora* ATCC14272, 1  $\mu\text{M}$  MAT182, 1  $\mu\text{M}$  MAT192, 100  $\mu\text{M}$  dNTP, 10  $\mu\text{l}$  Pfu-Polymerasepuffer 10x, 2,5 U Pfu-Polymerase (Zugabe bei 85 °C),  $\text{H}_2\text{O}$  ad 100  $\mu\text{l}$ .

25

30



Das PCR-Profil war 95 °C, 10 min (1 Zyklus); 85 °C, 5 min (1 Zyklus); 40 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 95 °C, 30 s (35 Zyklen); 72 °C, 10 min (1 Zyklus).

Hiermit wurde ein 358-bp-Fragment erhalten, dessen abgeleitete Peptidsequenz Ähnlichkeit zu den Sequenzen der Phytoendesaturasen aufwies. Durch die Methode der inversen PCR (Innis et al. in PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990. S. 219-227) wurden nach dem Prinzip des Chromosome-Walking die Genregionen stromaufwärts und stromabwärts des 350-bp-Fragmentes folgendermaßen amplifiziert, kloniert und sequenziert:

- (i) ein 1,1-kbp-Fragment durch PCR mit den Primern MAT219 5'-AAGTGACACCGGTTACACGCTTGTCTT-3' (SEQ. ID. NO:8) und MAT220 5'-GCTTATCACCATCTGTTACCTCCTTGC-3' (SEQ. ID. NO:9) erhalten aus 200 ng EcoRI-gespaltener und zirkularisierter genomischer DNA von *Blakeslea trispora* ATCC14272, 0,25 µM MAT219, 0,25 µM MAT220, 100 µM dNTP, 10 µl Herculase-Polymerasepuffer 10x, 5 U Herculase (Zugabe bei 85 °C), H<sub>2</sub>O ad 100 µl. Das PCR-Profil war 95 °C, 10 min (1 Zyklus); 85 °C, 5 min (1 Zyklus); 60 °C, 30 s, 72 °C, 60 s, 95 °C, 30 s (30 Zyklen); 72 °C, 10 min (1 Zyklus),
- (ii) ein 2,9-kbp-Fragment durch PCR mit den Primern MAT219 und MAT220 erhalten aus 200 ng XbaI-gespaltener und zirkularisierter genomischer DNA von *Blakeslea trispora* ATCC14272, 0,25 µM MAT219, 0,25 µM MAT220, 100 µM dNTP, 10 µl Herculase-Polymerasepuffer 10x, 5 U Herculase (Zugabe bei 85 °C), H<sub>2</sub>O ad 100 µl. Das PCR-Profil war 95 °C, 10 min (1 Zyklus); 85 °C, 5 min (1 Zyklus); 60 °C, 30 s, 72 °C, 3 min, 95 °C, 30 s (30 Zyklen); 72 °C, 10 min (1 Zyklus).

Der klonierte Sequenzabschnitt ist schematisch in Fig. 4 (SEQU. ID. No. 10) dargestellt. Die Sequenzierung erfolgte in Strang- und Gegenstrangrichtung mit den klonierten Fragmenten sowie mit den PCR-Produkten. Die Sequenz des klonierten Sequenzabschnitts ist in Fig. 5 (SEQU. ID. No. 11) gezeigt.

#### Sequenzvergleiche



Die Nukleotidsequenz von carB und die Peptidsequenz des abgeleiteten Proteins CarB wurden mit den bekannten Sequenzen verwandter Proteine verglichen. Zum Sequenzvergleich wurden die Programme GAP und BESTFIT eingesetzt.

#### **CarB - Identische Aminoacylreste nach GAP**

Programmeinstellungen:

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2.912

Average Mismatch: -2.003

Dabei wurde folgende Werte für die Übereinstimmung der Aminosäuren zu CarB aus *Blakeslea trispora* ATCC14272 in % gefunden:

*Phycomyces blakesleeanus*: 72,491

*Phaffia rhodozyma*: 50,460

*Neurospora crassa*: 47,943

*Cercospora nicotianae*: 47,740

#### **CarB - Identische Aminoacylreste nach BESTFIT**

Programmeinstellungen:

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2.912

Average Mismatch: -2.003

Dabei wurde folgende Werte für die Übereinstimmung der Aminosäuren zu CarB aus *Blakeslea trispora* ATCC14272 in % gefunden:

*Phycomyces blakesleeanus*: 73,380

*Phaffia rhodozyma*: 53,175

*Neurospora crassa*: 51,896

*Cercospora nicotianae*: 50,791

#### **carB - Identische Basen nach GAP**

Programmeinstellungen:

Gap Weight: 50



Length Weight: 3  
Average Match: 10.000  
Average Mismatch: 0.000

Dabei wurde folgende Werte für die Übereinstimmung der Basen zu CarB aus

5 Blakeslea trispora ATCC14272 in % gefunden:

Phycomyces blakesleeanus: 64,853

Cercospora nicotianae: 50,143

Phaffia rhodozyma: 43,179

Neurospora crassa: 42,130

10

#### **carB -Identische Basen nach BESTFIT**

Programmeinstellungen:

Gap Weight: 50

Length Weight: 3

15 Average Match: 10.000

Average Mismatch: -9.000

Dabei wurde folgende Werte für die Übereinstimmung der Basen zu CarB aus  
Blakeslea trispora ATCC14272 in % gefunden:

Phycomyces blakesleeanus: 68,926

20 Phaffia rhodozyma: 62,403

Neurospora crassa: 60,230

Cercospora nicotianae: 56,884

#### **Klonierung zur Expression von carB**

25 Zur Klonierung und Expression von carB aus Blakeslea trispora wurden von dem oben beschriebenen klonierten Sequenzabschnitt aus Blakeslea trispora in sechs Leserastern die möglichen Proteinsequenzen abgeleitet. Diese Proteinsequenzen wurden mit den Sequenzen der Phytoendesaturasen aus Phycomyces blakesleeanus, Phaffia rhodozyma, Neurospora crassa, Cercospora nicotianae verglichen. Auf der Grundlage des Sequenzvergleiches wurden im  
30 klonierten Sequenzabschnitt der genomischen DNA von Blakeslea trispora drei Exons identifiziert, die zusammengefügt eine codierende Region ergeben, deren abgeleitetes Genprodukt über die gesamte Länge 72,7% identische Aminoacylreste mit der Phytoendesaturase CarB aus Phycomyces blakesleeanus



aufweist. Dieser Sequenzabschnitt aus drei möglichen Exons und zwei möglichen Introns wurde daher als Gen *carB* bezeichnet. Zur Überprüfung der vorhergesagten Genstruktur wurde die codierende Sequenz von *carB* aus *Blakeslea trispora* durch PCR mit cDNA von *Blakeslea trispora* als Matrize und mit den

5 Primern Bol1425 5'-AGAGAGGGATCCTTAAATGCGAATATCGTTGC-3' (SEQ. ID. NO:12) und Bol1426 5'-AGAGAGGGATCCATGTCTGATCAAAAGAAGCA-3' (SEQ. ID. NO:13) erzeugt. Das erhaltene DNA-Fragment wurde sequenziert. Die Lokalisation von Exons und Introns wurde durch Vergleich der cDNA mit der genomischen DNA von *carB* bestätigt. In Fig. 5 ist die codierende Sequenz

10 von *carB* schematisch dargestellt. Zur Expression von *carB* in *Escherichia coli* wurde zunächst die *NdeI*-Schnittstelle in *carB* durch die Methode overlap extension PCR entfernt sowie am 5'-Ende des Gens eine *NdeI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle eingefügt. Das erhaltene DNA-Fragment wurde mit dem Vektor pJOE2702 ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde als pBT4

15 bezeichnet und zusammen mit pCAR-AE in *Escherichia coli* XL1-Blue kloniert. Die Expression erfolgte durch Induktion mit Rhamnose. Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte durch Nachweis der Lycopinsynthese via HPLC. Die Klonierungsschritte sind im folgenden beschrieben:

#### PCR 1.1:

20 Ca. 0,5 µg cDNA von *Blakeslea trispora*, 0,25 µM MAT350 5'-ACTTTATTGGATCCTTAAATGCGAATATCGTTGCTGC-3' (SEQ. ID. NO:14), 0,25 µM MAT244 5'-GTTCCAATTGGCCACATGAAGAGTAAGACAGGAAACAG-3' (SEQ. ID. NO:15), 100 µM dNTP, 10 µl Pfu-Polymerase-Puffer (10x), 2,5 U Pfu-Polymerase (Zugabe bei 85 °C, "hot start") und H<sub>2</sub>O ad 100µL.

25

#### Temperaturprofil:

1. 95 °C 10 min, 2. 85 °C 5 min, 3. 40 °C 30s, 4. 72 °C 1 min 30 s, 5. 95 °C 30 s, 6. 50 °C 30 s, 7. 72 °C 1 min 30 s, 8. 95 °C 30 s, 9. 72 °C 10min

Zyklen: (1-2.) 1x, (3-5.) 5x, (6-8.) 25x, (9.) 1x

#### PCR1.2:

Ca. 0,5 µg cDNA von *Blakeslea trispora*, 0,25 µM MAT243 5'-CCTGTCTTACTCTTCATGTGGCCAATTGGAACCAACAC-3' (SEQ. ID. NO:16), 0,25 µM MAT353 5'-



CTATTTTAATCATATGTCTGATCAAAAGAAGCATATTG-3' (SEQ. ID. NO:17),  
100 µM dNTP, 10 µl Pfu-Polymerase-Puffer (10x), 2,5 U Pfu-Polymerase (Zugabe bei 85 °C, "hot start") und H<sub>2</sub>O ad 100 µL.

Temperaturprofil:

- 5 1. 95 °C 10 min, 2. 85 °C 5 min, 3. 40 °C 30s, 4. 72 °C 1 min 30 s, 5. 95 °C 30 s, 6. 50 °C 30 s, 7. 72 °C 1 min 30 s, 8. 95 °C 30s, 9. 72 °C 10min

Zyklen: (1 -2.) 1x, (3-5.) 5x, (6-8.) 25x, (9.) 1x

### Reinigung der PCR-Fragmente aus PCR 1.1, 1.2

- 10 Dazu wurde PCR 2 zur Herstellung der codierenden Sequenz von carB aus *Blakeslea trispora* für die Klonierung in pJOE2702 durchgeführt:

Ca. 50 ng Produkt aus PCR 1.1 und ca. 50 ng Produkt aus PCR1.2 mit 0,25 µM MAT350 5'-ACTTTATTGGATCCTTAAATGCGAATATCGTTGCTGC-3', 0,25 µM MAT353 5'-CTATTTTAATCATATGTCTGATCAAAAGAAGCATATTG-3',

- 15 100 µM dNTP, 10 µL Pfu-Polymerase-Puffer (10x), 2,5 U Pfu-Polymerase (Zugabe bei 85 °C, "hot start") und H<sub>2</sub>O ad 100 µL.

Temperaturprofil:

1. 95°C 10 min, 2. 85 °C 5 min, 3. 59 °C 30 s, 4. 72 °C 2 min, 5. 95 °C 30 s, 6. 72°C 10 min

- 20 Zyklen: (1-2.) 1x, (3-5.) 22x, (6.) 1x

Anschließend erfolgte eine Reinigung des erhaltenen Fragmentes (~ 1,7 kbp), eine Ligation in Vektor pPCR-Script-Amp, eine Klonierung in *Escherichia coli* XL1-Blue, Sequenzierung der Insertion, Spaltung mit NdeI und BamHI sowie eine Ligation in pJOE2702. Das erhaltene Plasmid wurde als pBT4 bezeichnet.

25

### Charakterisierung und Nachweis der Enzymaktivität von CarB (Phytoendesaturase)

Das von carB abgeleitete Genprodukt wurde als CarB bezeichnet. CarB weist auf Grundlage der Peptidsequenzanalyse folgende Eigenschaften auf:

- |                         |                    |
|-------------------------|--------------------|
| 30 Länge:               | 582 Aminoacylreste |
| Molekulare Masse:       | 66470              |
| Isoelektrische Punkt:   | 6,7                |
| Katalytische Aktivität: | Phytoendesaturase  |
| Edukt:                  | Phytoen            |



Produkt: Lycopin  
EC-Nummer: EC 1.14.99-

Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte in vivo. Wenn das Plasmid (pCAR-AE) in Escherichia coli XL1-Blue übertragen wird, entsteht der Stamm Escherichia coli XL1-Blue (pCAR-AE). Dieser Stamm synthetisiert Phytoen. Wenn zusätzlich das Plasmid pBT4 in Escherichia coli XL1-Blue übertragen wird, entsteht der Stamm Escherichia coli XL1-Blue (pCAR-AE)(pBT4). Da ausgehend von carB eine enzymatisch aktive Phytoendesaturase gebildet wird, produziert dieser Stamm Lycopin.

Die Plasmide pCAR-AE und pBT4 wurden daher in Escherichia coli übertragen. Nach Wachstum in Flüssigkultur wurden die Carotinoide aus den Zellen extrahiert und charakterisiert (vgl. oben).

Durch HPLC Analyse wurde nachgewiesen, daß der Stamm Escherichia coli XL1-Blue (pCAR-AE) Phytoen und der Stamm Escherichia coli XL1-Blue (pCAR-AE)(pBT4) Lycopin produziert. CarB weist folglich die Enzymaktivität einer Phytoendesaturase auf.

#### **Vector pBinAHyg $\Delta$ carB zur Erzeugung von carB<sup>-</sup>-Mutanten von Blakeslea trispora**

Die Amplifikation der codierenden Sequenz von carB mit den Primern MAT350 und MAT353 mittels PCR wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt:

50 ng pBT4 mit 0,25  $\mu$ M MAT350 5'-ACTTTATTGGATCCTTAAAT-GCGAATATCGTTGCTGC-3', 0,25  $\mu$ M MAT353 5'-CTATTTTAATCATATGT-CTGATCAAAGAAGCATATTG-3', 100  $\mu$ M dNTP, 10  $\mu$ L Pfu-Polymerase-Puffer, 2,5 U Pfu-Polymerase (Zugabe bei 85 °C, "hot start") und ad 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O

Temperaturprofil:

1. 95 °C 10 min, 2. 85 °C 5 min, 3. 58 °C 30s, 4. 72°C 2 min, 5. 95 °C 30s, 6. 72 °C 10 min.

Zyklen: (1.-2.) 1x, (3-5.) 30x, (6.) 1x



Anschließend erfolgte eine Reinigung des erhaltenen Fragmentes (~ 1,7 kbp), eine Spaltung mit HindIII, eine weitere Reinigung des 364-bp-HindIII-Fragments-carB, gefolgt von einer Spaltung von pBinAHyg mit HindIII, eine Ligation von 364-bp-HindIII-Fragments-carB in pBinAHyg, eine Transformation des Vektors in *Escherichia coli* und eine Isolierung des Konstruktes und Bezeichnung als pBinAHyg $\Delta$ carB wie oben beschrieben. Alternativ erfolgte eine partielle Spaltung mit HindIII und die Klonierung eines größeren HindIII-Fragmentes aus carB in pBinAHyg zur Herstellung von pBinAHyg $\Delta$ carB.

#### 10 Erzeugung von carB<sup>-</sup> -Mutanten von *Blakeslea trispora*

Zunächst wurde das Plasmid pBinAHyg $\Delta$ carB in den Agrobakterienstamm LBA 4404 übertragen, z. B. durch Elektroporation (vgl. oben). Anschließend wurde das Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 in *Blakeslea trispora* ATCC 14272 und in *Blakeslea trispora* ATCC 14271 übertragen (vgl. oben). Der erfolgreiche Nachweis des Gentransfers in *Blakeslea trispora* erfolgte über Polymerase-Kettenreaktion nach folgendem Protokoll:

Ca. 0,5  $\mu$ g DNA aus *Blakeslea trispora* ATCC 14272 carB<sup>-</sup> bzw. ATCC 14271 carB<sup>-</sup> wurden mit 0,25  $\mu$ M Primer hph forward 5'-CGATGTAGGAGGGCGTGGATA-3', 0,25  $\mu$ M Primer hph reverse 5'-GCTTCTGCGGGCGATTTGTGT-3', 100  $\mu$ M dNTP, 10  $\mu$ L Herculase-Polymerase-Puffer, 2,5 U Herculase-DNA-Polymerase (Zugabe bei 85 °C, "hot start") und ad 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O umgesetzt.

Temperaturprofil:

1. 95 °C 10 min, 2. 85 °C 5 min, 3. 58 °C 1 min, 4. 72 °C 1 min, 5. 94 °C 1 min, 6. 72 °C 10 min.

Zyklen: (1.-2.) 1x, (3-5.) 30x, (6.) 1x

Als Negativkontrolle wurde eine Amplifikation des Kanamycinresistenzgens aus *Agrobacterium* versucht. Dazu wurden folgende PCR-Bedingungen verwendet:

Ca. 0,5  $\mu$ g DNA aus *Blakeslea trispora* ATCC 14272 carB<sup>-</sup> bzw. ATCC 14271 carB<sup>-</sup> wurden mit 0,25  $\mu$ M Primer nptIII forward 5'-TGAGAATATCACCGGAATTG-3', 0,25  $\mu$ M Primer nptIII reverse 5'-AGCTCGACATACTGTTCTTCC-3', 100  $\mu$ M dNTP, 10  $\mu$ L Herculase-



Polymerase-Puffer, 2,5 U Herculase-DNA-Polymerase (Zugabe bei 85 °C, "hot start") und ad 100 µL H<sub>2</sub>O umgesetzt.

Temperaturprofil:

1. 95 °C 10 min, 2. 85 °C 5 min, 3. 58 °C 1 min, 4. 72 °C 1 min, 5. 94 °C 1 min,

5 6. 72 °C 10 min-

Zyklen: (1-2.) 1x, (3-5.) 30x, (6.) 1x

### Isolierung homokaryontischer carB<sup>-</sup>-Mutanten von *Blakeslea trispora*

10 Durch Transfer des Plasmids pBinAHygΔcarB in *Blakeslea trispora* und homologe Rekombination entstanden Insertionsmutanten, die zwei unvollständige Kopien von carB in jeweils einem Kern enthielten. Die betroffenen Kerne zeigten folglich den Genotyp carB<sup>-</sup>. Da in *Blakeslea* jedoch in allen Stadien des vegetativen und des sexuellen Zellzyklus mehrkernige Zellen vorliegen, wird die rezessive Mutation carB<sup>-</sup> nicht als Phänotyp ausgeprägt. Um die rezessive Mutation zur Ausprägung zu bringen, wurden daher homokaryotische Zellen erzeugt, die in allen Zellkernen die rezessive Mutation tragen. Zur Herstellung homokaryonter Zeilen mit den Genotypen carB<sup>-</sup>, hyg<sup>R</sup> und dar<sup>-</sup> wurde eine Sporensuspension der carB<sup>-</sup>-Stämme mit MNNG nach der obigen Vorschrift behandelt. Die Überlebensrate nach MNNG-Behandlung betrug ca. 5%. Anschließend wurden die Sporen auf MEP-Agarplatten ausplattiert und neue Sporen erzeugt. Diese Sporen wurden analog zur Vorschrift von Roncero et al. auf Medium mit 5-Carbon-5-deazariboflavin plattiert, das zusätzlich Hygromycin enthielt. Hierdurch wurden homokaryotische Zellen des Genotyps carB<sup>-</sup>, hyg<sup>R</sup> und dar<sup>-</sup> selektiert. Nach diesem Prinzip wurden sowohl (+) als auch (-) Stämme von *Blakeslea trispora* mit dem Phänotyp carB<sup>-</sup>, hyg<sup>R</sup> und dar<sup>-</sup> erzeugt. Diese Stämme sind resistent gegen 5-Carbon-5-deazariboflavin, Hygromycin und produzieren Phytoen.

### Phytoenproduktion mit den carB<sup>-</sup>-Mutanten von *Blakeslea trispora*

30 Zur Produktion von Phytoen wurden die homokaryonten *Blakeslea trispora* (+) und (-) Stämme des Genotyps carB<sup>-</sup>, hyg<sup>R</sup> und dar<sup>-</sup> wie oben angegeben (S. 11) fermentiert, das produzierte Phytoen mittels HPLC Analyse nachgewiesen und isoliert.



Das Flüssigmedium zur Produktion von Phytoen enthielt pro Liter: 19 g Maismehl, 44 g Sojamehl, 0,55 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,002 g Thiaminhydrochlorid, 10 % Sonnenblumenöl. Der pH wurde mit KOH auf 7,5 eingestellt.

- 5 Zur Herstellung von Phytoen wurden Schüttelkolben mit Sporensuspensionen von (+) und (-) Stämmen von *Blakeslea trispora carB<sup>-</sup>* beimpft. Die Schüttelkolben wurden bei 26 °C mit 250 rpm für 7 Tage inkubiert. Alternativ wurde zu Mischungen der Stämme nach 4 Tagen Trisporsäuren zugegeben und weitere 3 Tage inkubiert. Die Endkonzentration der Trisporsäuren betrug 300 - 400 µg/ml.

10

Trisporsäuren sind Sexualhormone in Mucorales Pilzen, wie *Blakeslea*, welche die Bildung von Zygophoren und die Produktion von  $\beta$ -Carotin stimulieren (van den Ende 1968, J. Bacteriol. 96:1298 - 1303, Austin et al. 1969, Nature 223:1178 - 1179, Reschke Tetrahedron Lett. 29:3435 - 3439, van den Ende 15 1970, J. Bacteriol. 101:423 - 428).

### Extraktion und Analytik

#### Extraktion:

1. Entnahme von 10 ml Kultursuspension
- 20 2. Zentrifugation, 10 min, 5.000 x g
3. Verwerfen des Überstandes
4. Resuspendierung des Pellets in 1 ml Tetrahydrofuran (THF) durch Vortexen
5. Zentrifugation, 5 min, 5.000 x g
- 25 6. Abnahme der THF-Phase
7. Wiederholung der Schritte 4.-6. (2 x)
8. Vereinigung der THF-Phasen
9. Zentrifugation der vereinigten THF-Phasen 5 min bei 20.000 x g, um Reste der wäßrigen Phase abzutrennen

30

#### Analytik

##### Messung von Phytoen mittels HPLC

Säule: ZORBAX Eclipse XDB-C8, 5 µm, 150\*4,6 mm  
Temperatur: 40 °C



Flußrate: 0,5 ml/min

Injektionsvolumen: 10 µl

Detektion: UV 220 nm

Stoppzeit: 12 min

5 Nachlaufzeit: 0 min

Maximaldruck: 350 bar

Eluent A: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2,5 mit Perchlorsäure

Eluent B: Acetonitril

Gradient:

10	Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluß [ml/min]
	0	50	50	0,5
	12	50	50	0,5

15 Als Matrix wurden Extrakte der Fermentationsbrühen verwendet. Vor der HPLC wurde jede Probe durch ein 0,22 µm Filter filtriert. Die Proben wurden kühl gehalten und vor Licht geschützt. Zur Kalibrierung wurden jeweils 50 - 1000 mg/l eingewogen und in THF gelöst. Als Standard wurde Phytoen verwendet, welches unter den gegebenen Bedingungen eine Retentionszeit von 7,7 min. aufweist.

20 **Messung von Lycopin mittels HPLC**

Säule: Nucleosil 100-7 C18, 250\*4,0 mm (Macherey & Nagel)

Temperatur: 25 °C

Flußrate: 1,3 ml/min

25 Injektionsvolumen: 10 µl

Detektion: 450 nm

Stoppzeit: 15min

Nachlaufzeit: 2 min

Maximaldruck: 250 bar

30 Eluent A: 10% Aceton, 90% H<sub>2</sub>O

Eluent B: Aceton

Gradient:

Zeit [min]	A [%]	B [%]	Fluß [ml/min]
0	30	70	1,3



10	5	95	1,3
12	5	95	1,3
13	30	70	1,3

- 5 Als Matrix wurden Extrakte der Fermentationsbrühen verwendet. Vor der HPLC wurde jede Probe durch ein 0,22 µm Filter filtriert. Die Proben wurden kühl gehalten und vor Licht geschützt. Zur Kalibrierung wurden jeweils 10 mg eingewogen und in 100 ml THF gelöst. Als Standard wurde Lycopin verwendet, welches unter den gegebenen Bedingungen eine Retentionszeit von 12,3 min. aufweist.
- 10



Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen mittels gentechnisch veränderter Organismen der Gattung *Blakeslea* umfassend
  - 5 (i) Transformation mindestens einer der Zellen,
  - (ii) ggf. Homokaryotisierung der aus (i) erhaltenen Zellen durch Eliminierung von Kernen in diesen Zellen, so dass mindestens eine Zelle mit nur einem Kern verbleibt, der die gewünschte genetische Veränderung aus (i) aufweist und zur Ausprägung führt,
  - (iii) Selektion und Vermehrung der gentechnisch veränderten Zelle oder Zellen, und
  - (iv) Isolierung des von den gentechnisch veränderten Zellen produzierten Carotinoids oder der von den gentechnischen veränderten Zellen produzierten Carotinoidvorstufe.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich um Zellen von Pilzen der Art *Blakeslea trispora* handelt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** in der Transformation (i) ein Vector oder freie Nukleinsäuren verwendet werden.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** der in der Transformation (i) eingesetzte Vector in das Genom mindestens einer der Zellen integriert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** der in der Transformation (i) eingesetzte Vector derart gestaltet ist, dass die im Vector enthaltene genetische Information in der Zelle ausgeschaltet wird.
- 25 6. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** der in der Transformation (i) eingesetzte Vector derart gestaltet ist, dass die im Vector enthaltene genetische Information in die Zelle eingeführt wird.



7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 3 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** der in der Transformation (i) eingesetzte Vector einen Promotor und/oder einen Terminator enthält.
- 5 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 3 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** in der Transformation (i) ein Vector enthaltend den gpd Promotor und/oder den trpC Terminator eingesetzt wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 3 bis 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** in der Transformation (i) ein Vector enthaltend ein Resistenzgen eingesetzt wird.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** der in der Transformation (i) eingesetzte Vector ein Hygromycin-Resistenzgen (hph), insbesondere aus E. coli enthält.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 7 - 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** der gpd Promotor die Sequenz SEQ. ID. NO:1 aufweist.
- 15 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 7 - 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** der trpC Terminator die Sequenz SEQ. ID. NO:2 aufweist.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** der gpd Promotor und der trpC Terminator aus Aspergillus nidulans stammen.
- 20 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Transformation (i) mittels Agrobakterien, Konjugation, Chemikalien, Elektroporation, Beschuss mit DNA-beladenen Partikeln, Protoplasten oder Mikroinjektion durchgeführt wird.
- 25 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** in der Homokaryotisierung (ii) ein mutagenes Agens eingesetzt wird.



16. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass als mutagenes Agens N-Methyl-N'-nitro-nitrosoguanidin (MNNG) eingesetzt wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass in der Selektion (iii) 5-Carbon-5-deazariboflavin (darf) und Hygromycin (hyg) eingesetzt werden.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass der in der Transformation (i) eingesetzte Vector genetische Informationen zur Herstellung von Carotinoiden oder deren Vorstufen enthält.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass der in der Transformation (i) eingesetzte Vector genetische Informationen zur Herstellung von Carotinen oder Xanthophyllen enthält.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, dass der in der Transformation (i) eingesetzte Vector genetische Informationen zur Herstellung von Astaxanthin, Zeaxanthin, Echinenon,  $\beta$ -Cryptoxanthin, Andonixanthin, Adonirubin, Canthaxanthin, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Lycopin,  $\beta$ -Carotin, Lutein oder Phytoen enthält.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass durch die Transformation (i) das Gen der Phytoendesaturase ausgeschaltet wird.

22. Verfahren nach einem Ansprüche 3 bis 21, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Vector die SEQ. ID. NO:3 umfasst.

23. Carotinoiden oder deren Vorstufen, insbesondere Phytoen erhältlich nach einem der vorhergehenden Ansprüche.

24. Verwendung von Carotinoiden oder deren Vorstufen, insbesondere Phytoen nach Anspruch 23 zur Herstellung von kosmetischen, pharmazeutischen oder dermatologischen Zubereitungen.



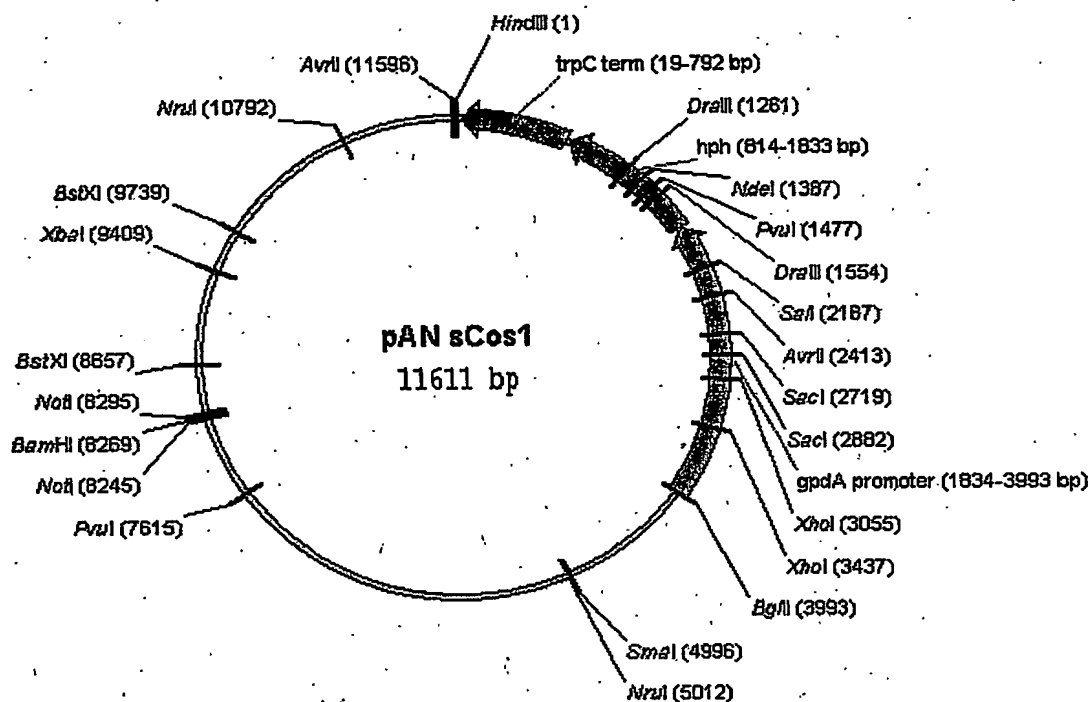
25. Promotor mit der Sequenz SEQ. ID. NO:1 zur Verwendung in dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 22.

26. Terminator mit der Sequenz SEQ. ID. NO:2 zur Verwendung in dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 22.

5 27. Vector mit der SEQ. ID. NO:3 zur Verwendung in dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 22.



**Fig. 1: Vektor pANsCos1**



**Fig. 2: Vektor pBinAHyg**

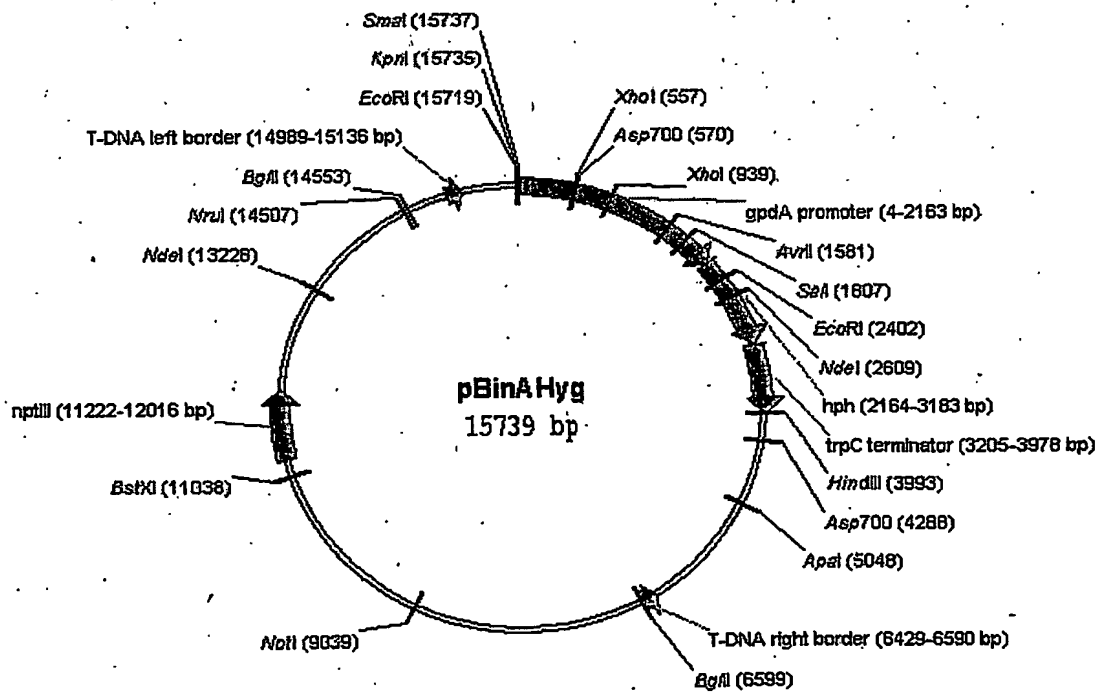




Fig. 3: Vector pBinAHyg $\Delta$ carB

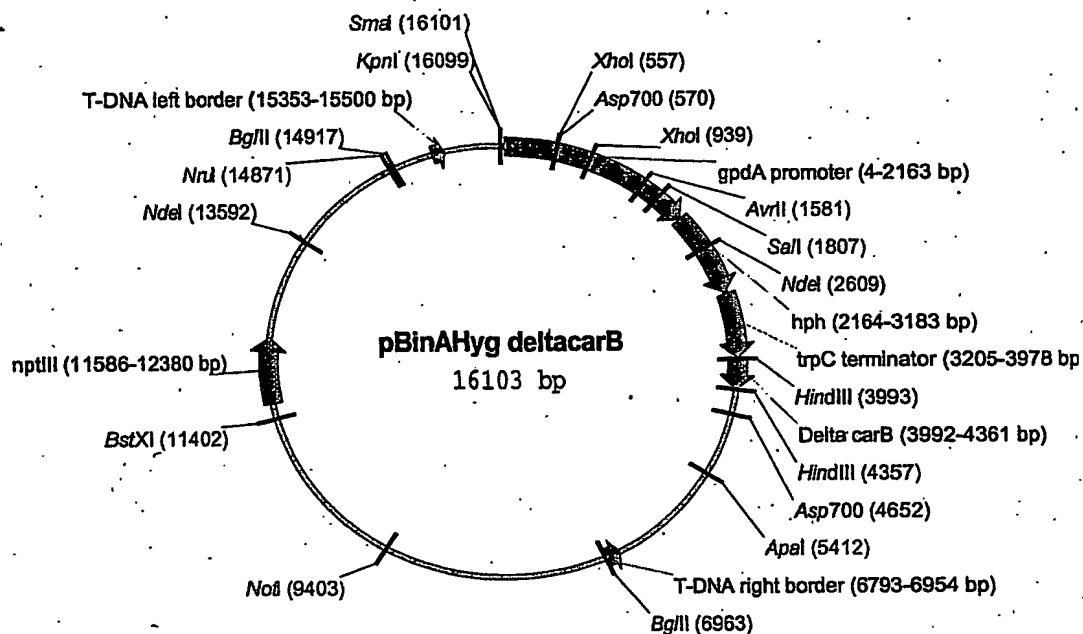


Fig. 4: carB

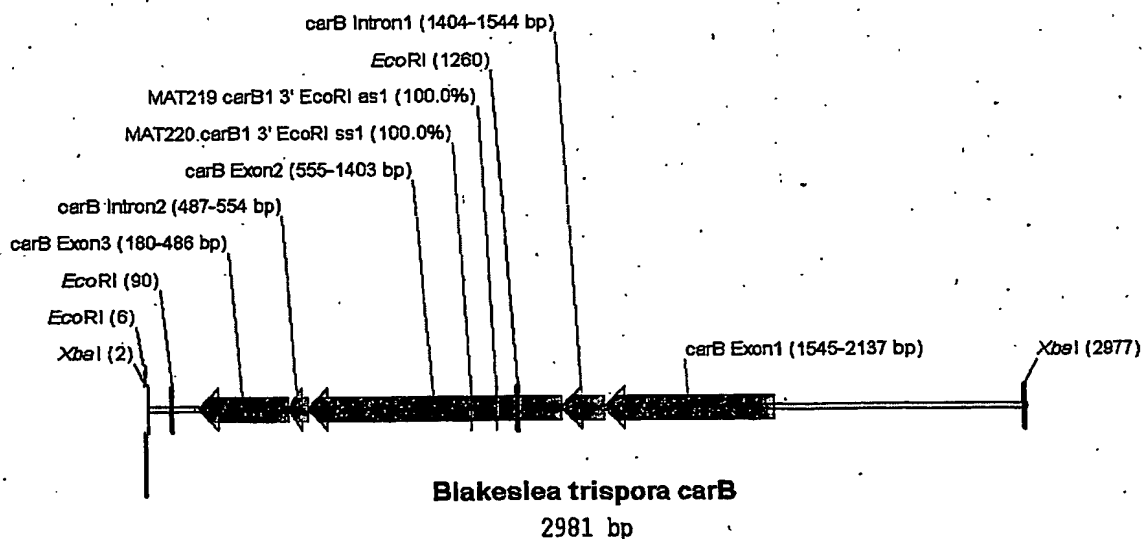
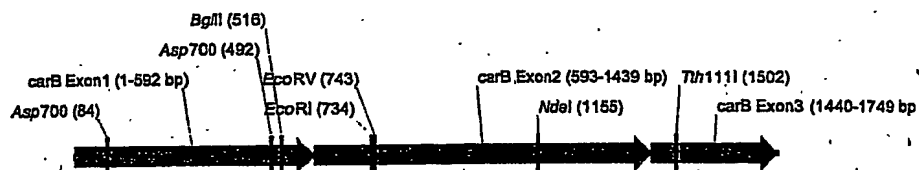




Fig. 5: CDS von carB





SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF AG

<120> Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden oder deren  
Vorstufen mittels gentechnisch veränderten Organismen  
der Gattung *Blakeslea*, mit dem Verfahren hergestellte  
Carotinoide oder deren Vorstufen und deren Verwendung

<130> BASF NAE 579/03

<140>

<141>

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2160

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Promotor

<400> 1

tttcgacac tgaaatacgt cgagcctgct ccgcttggaa ggggcgagga gcctcgtcct 60  
gtcacaacta ccaacatgga gtacgataag ggccagttcc gccagctcat taagagccag 120  
ttcatgggcy ttggcatgat ggccgtcatg catctgtact tcaagtacac caacgctctt 180  
ctgatccagt cgatcatccg ctgaaggcgc tttcgaatct ggtaagatc cacgtcttcg 240  
ggaagccagc gactggtgac ctccagcgtc cctttaaggc tgccaacagc tttctcagcc 300  
agggccagcc caagaccgac aaggcctccc tccagaacgc cgagaagaac tggaggggtg 360  
gtgtcaagga ggagtaagct ctttatggaa gtcggaggac ggagcgggtg caagaggata 420  
ttcttcgact ctgtattata gataagatga tgaggaattg gaggtagcat agcttcattt 480  
ggatttgctt tccaggctga gactctagct tggagcatag agggtccttt ggctttcaat 540  
attctcaagt atctcgagtt tgaacttatt ccctgtgaac cttttattca ccaatgagca 600  
ttggaatgaa catgaatctg aggactgcaa tcgccatgag gttttcgaaa tacatccgga 660  
tgtcgaaggc ttggggcacc tgcgttggtt gaatttagaa cgtggcacta ttgatcatcc 720  
gatagctctg caaagggcgt tgcacaatgc aagtcaaacg ttgctagcag ttccaggtgg 780  
aatgttatga tgagcattgt attaaatcag gagatatagc atgatctcta gttagctcac 840



BASF AG  
BASF NAE 579/03

2/81

4. September 2003

```

cacaaaagtc agacggcgta accaaaagtc acacaaacaca agctgtaagg atttcggcac 900
ggctacggaa gacggagaag ccaccttcag tggactcgag taccatttaa ttctatttgt 960
gtttgatcga gacctaatac agcccctaca acgaccatca aagtcgtata gctaccagtg 1020
aggaagtgga ctcaaatega cttcagcaac atctcctgga taaactttta gcctaaacta 1080
tacagaataa gataggtgga gagcttatac cgagctccca aatctgtcca gatcatgggt 1140
gaccggtgcc tggatcttcc tatagaatca tccttattcg ttgacctagc tgattctgga 1200
gtgaccaga gggatcatgac ttgagcctaa aatccgccc ctcaccatt tgtagaaaaa 1260
tgtgacgaac tcgtgagctc tgtacagtga ccggtgactc tttctggcat gcggagagac 1320
ggacggacgc agagagaagg gctgagtaat aagccactgg ccagacagct ctggcggtc 1380
tgaggtgcag tggatgatta ttaatccggg accggccggc cctccgcccc gaagtggaaa 1440
ggctggtgtg cccctcggtg accaagaatc tattgcatca tcggagaata tggagcttca 1500
tcgaatcacc ggcagtaagc gaaggagaat gtgaagccag ggggtgtatag ccgtcggcga 1560
aatagcatgc cataaccta ggtacagaag tccaattgct tccgatctgg taaaagattc 1620
gagatagt accttctccg aagtaggtag agcaggtacc cggcgcgtaa gctcccta 1680
ggcccatcc ggcattctgta gggcgctcaa atatcgtgcc tctcctgctt tgcccggtgt 1740
atgaaaccgg aaaggccgct caggagctgg ccagcggcgc agaccgggaa cacaaagctg 1800
cagtcgaccc atccggtgct ctgcactcga cctgctgagg tccctcagtc cctggtaggc 1860
agctttgccc cgtctgtccg cccggtgtgt cggcgggggt gacaaggctc ttgcgtcagt 1920
ccaacatttg ttgccatatt ttcctgctct cccaccagc tgctcttttc ttttctcttt 1980
cttttcccat cttcagtata ttcatcttcc catccaagaa cttttatttc ccctaagtaa 2040
gtactttgct acatccatac tccatccttc ccacccctta ttcttttgaa cttttcagtt 2100
cgagctttcc cacttcatcg cagcttgact aacagctacc ccgcttgagc agacatcacc 2160

```

<210> 2

<211> 774

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Terminator

<400> 2

```

cgatccactt aacgttactg aaatcatcaa acagcttgac gaatctggat ataagatcgt 60
tgggtgctgat gtcagctccg gagttgagac aaatgggtgt caggatctcg ataagatacg 120
ttcattttgtc caagcagcaa agagtgcctt ctagtgattt aatagctcca tgtcaacaag 180
aataaaacgc gttttcgggt ttacctcttc cagatacagc tcatctgcaa tgcattaatg 240
cattgactgc aacctagtaa cgccttnnag gctccggcga agagaagaat agcttagcag 300
agctattttt attttcggga gacgagatca agcagatcaa cggtcgtcaa gagacctacg 360
agactgagga atccgctctt ggctccacgc gactatatat ttgtctctaa ttgtactttg 420
acatgctcct cttctttact ctgatagctt gactatgaaa attcgtcac cagcncctgg 480

```



gttcgcaaag ataattgcat gtttcttcc tgaactctca agcctacagg acacacattc 540  
atcgtaggta taaacctcga aatcanttcc tactaagatg gtatacaata gtaaccatgc 600  
atggttgcct agtgaatgct ccgtaacacc caatacgccg gccgaaactt ttttacaact 660  
ctcctatgag tcgtttaccc agaatgcaca ggtacacttg ttttagaggta atccttcttt 720  
ctagctagaa gtcctcgtgt actgtgtaag cgccactcc acatctccac tcga 774

<210> 3

<211> 16103

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Vector

<400> 3

gatctttcga cactgaaata cgtcgagcct gctccgcttg gaagcggcga ggagcctcgt 60  
cctgtcacaa ctaccaacat ggagtagcat aagggccagt tccgccagct cattaagagc 120  
cagttcatgg gcgttggcat gatggccgtc atgcatctgt acttcaagta caccaacgct 180  
cttctgatcc agtcgatcat ccgctgaagg cgctttcgaa tctggttaag atccacgtct 240  
tcgggaagcc agcgactggt gacctccagc gtccctttaa ggctgccaac agctttctca 300  
gccagggcca gcccaagacc gacaaggcct ccctccagaa cgccgagaag aactggaggg 360  
gtggtgtcaa ggaggagtaa gtccttatt gaagtcggag gacggagcgg tgtcaagagg 420  
atattcttcg actctgtatt atagataaga tgatgaggaa ttggaggtag catagcttca 480  
tttggaattg ctttccaggc tgagactcta gcttgagca tagagggtcc tttggctttc 540  
aatattctca agtatctcga gtttgaactt attccctgtg aaccttttat tcaccaatga 600  
cattggaat gaacatgaat ctgaggactg caatcgccat gaggttttcg aaatacatcc 660  
gatgtcgaa ggcttggggc acctgcgttg gttgaattta gaacgtggca ctattgatca 720  
tccgatagct ctgcaaaggg cgttgcacaa tgcaagtcaa acgttgctag cagttccagg 780  
tggaatgtta tgatgagcat tgtattaaat caggagatat agcatgatct ctagttagct 840  
caccacaaaa gtcagacggc gtaacaaaaa gtcacacaac acaagctgta aggatttcgg 900  
cacggctacg gaagacggag aagccacctt cagtggactc gagtaccatt taattctatt 960  
tgtgtttgat cgagacctaa tacagccctt acaacgacca tcaaagtcgt atagctacca 1020  
gtgaggaagt ggactcaaat cgacttcagc aacatctcct ggataaactt taagcctaaa 1080  
ctatacagaa taagataggt ggagagctta taccgagctc ccaaactctgt ccagatcatg 1140  
gttgaccggt gcctggatct tcctatagaa tcaccttat tcgttgacct agctgattct 1200  
ggagtgacct agagggtcat gacttgagcc taaaatccgc cgctccacc atttgtagaa 1260  
aatgtgacg aactcgtgag ctctgtacag tgaccgggtga ctctttctgg catgaggaga 1320  
gacggacgga cgagagaga agggctgagt aataagccac tggccagaca gctctggcgg 1380  
ctctgagggt cagtggatga ttattaatcc gggaccggcc gccctecgc cccgaagtgg 1440  
aaaggctggt gtgcccctcg ttgaccaaga atctattgca tcacggaga atatggagct 1500



BASF AG  
BASF NAE 579/03

4/81

24. September 2003

tcacgaatc accggcagta agcgaaggag aatgtgaagc caggggtgta tagccgtcgg 1560  
cgaaatagca tgccattaac ctaggtagag aagtcgaatt gcttccgacg tggtaaaaga 1620  
ttcacgagat agtaccttct ccgaagtagg tagagcgagt acccggcgcg taagctccct 1680  
aattggccca tccggcatct gtagggcgct caaatatcgt gcctctcctg ctttgccccg 1740  
tgtatgaaac cggaaggcc gctcaggagc tggccagcgg cgcagaccgg gaacacaagc 1800  
tggcagtcga cccatccggg gctctgcaact cgacctgctg aggtccctca gtccctggta 1860  
ggcagctttg ccccgctctg cggcccggtg tgcggcgagg gttgacaagg tcgttgcgct 1920  
agtccaacat ttgttgccat attttctctg tctccccacc agctgctctt ttcttttctc 1980  
tttcttttcc catcttcagt atattcatct tcccatccaa gaacctttat ttcccttaag 2040  
taagtacttt gctacatcca tactccatcc ttcccatccc ttattccttt gaacctttca 2100  
gttcgagctt tcccacttca tgcgagcttg actaacagct acccgcttg agcagacatc 2160  
accatgcctg aactcacgc gacgtctgtc gagaagtttc tgatcgaaaa gttcgacagc 2220  
gtctccgacc tgatgcagct ctgggagggc gaagaatctc gtgctttcag cttcgatgta 2280  
tggggcgctg gatatgtcct gggggtaaat agctgcgcgc atggtttcta caaagatcgt 2340  
catgtttatc ggcactttgc atcgcccgcg ctcccgatcc cggaagtgtc tgacattggg 2400  
gaattcagcg agagcctgac ctattgcac tcccgccgtg cacagggtgt cacgttgcaa 2460  
gacctgcctg aaaccgaact gcccgtgtt ctgcagccgg tcgaggaggc catggatgcg 2520  
atcgctgcgg ccgatcttag ccagacgagc ggggttcggcc cattcggacc gcaaggaatc 2580  
ggtaataca ctacatggcg tgatttcata tgcgcgattg ctgatcccca tgtgtatcac 2640  
tggcaaactg tgatggagca caccgtcagt gcgtccgctg cgcaggctct cgatgagctg 2700  
atgctttggg ccgaggactg ccccggaagc cggcacctcg tgcacgcgga ttccggctcc 2760  
aacaatgtcc tgacggacaa tggcgcgata acagcgggtc ttgactggag cgaggcgatg 2820  
ttcgggggatt cccaatacga ggtcgccaac atcttcttct ggaggccgtg gttggcttgt 2880  
atggagcagc agacgcgcta cttcgagcgg aggcacccgg agcttgacag atcgccgcgg 2940  
ctccggggcgt atatgctccg cattgggtctt gaccaactct atcagagctt ggttgacggc 3000  
aatttcgatg atgcagcttg ggcgcagggt cgatgcgacg caatcgtccg atccggagcc 3060  
ggactgtcg ggcgtacaca aatcgcccg cgaagcgcg cgtctggac cgatggctgt 3120  
tgaagtac tgcggatag tggaaaccga cggcccgca ctgctccgag ggcaaaggaa 3180  
tagagtagat gccgaccgcg ggatcgatcc acttaacgtt actgaaatca tcaaacagct 3240  
tgacgaatct ggatataaga tgcgttggtg cgatgtcagc tccggagttg agacaaatgg 3300  
tgttcaggat ctcgataaga tacgttcatt tgtccaagca gcaaagagtg ctttctagt 3360  
atttaatagc tccatgtcaa caagaataaa acgcgttttc gggtttacct cttccagata 3420  
cagctcatct gcaatgcatt aatgcattga ctgcaacctg gtaacgcctt ncaggctccg 3480  
gcgaagagaa gaatagctta gcagagctat tttcattttc gggagacgag atcaagcaga 3540  
tcaacggctg tcaagagacc tacgagactg aggaatccgc tcttggtcc acgcgactat 3600  
atatttgtct ctaattgtac ttgacatgc tctcttctt tactctgata gcttgactat 3660  
gaaaattccg tcaccagcnc ctgggttcgc aaagataatt gcatgtttct tcttgaact 3720  
ctcaagccta caggacacac attcatcgta ggtataaacc tcgaaatcan ttcctactaa 3780  
gatggtatac aatagtaacc atgcatggtt gcctagttaa tgctccgtaa caccaatac 3840  
gccggccgaa acttttttac aactctccta tgagtcgttt acccagaatg cacaggatca 3900  
cttgtttaga ggtaatcctt ctttctagct agaagtcctc gtgtactgtg taagcgccca 3960



ctccacatct ccactcgacc tgcaggcatg caagcttgag tctatcgcct ccaaaaagta 4020  
cggtgctgaa ttcagatata aatcgcctgt tgctaaaatt aactctgtcg ataaagacaa 4080  
gcgtgtaacc ggtgtcactt tggaaagcgg agaagtcatt gaagccgatg cagtcgtatg 4140  
taatgcggat cttgtttatg cttatcacca tctgttacct ccttgcaatt ggacaaagaa 4200  
gacattagcc tcaaagaaac tcaacttcac atctatttcg ttttattggg ccatgtcaac 4260  
aaagggtgct caattagacg tacacaatat cttcttggct gaagcctaca aggaaagttt 4320  
tgatgagatt ttcaacgact tcggtttgcc ctctgaagct tggcgtaatc atgggtcatag 4380  
ctgttttctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc 4440  
ataaagtgtg aagcctgggg tgcctaata gtagactaac tcacattaat tgcgttgccg 4500  
tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa 4560  
cgcgccggga gaggcggttt gcgtattggg ccaaagacaa aagggcgaca ttcaaccgat 4620  
tgagggaggg aaggtaaata ttgacggaaa ttattcatta aagggtgaatt atcaccgtca 4680  
ccgacttgag ccatttggga attagagcca gcaaatcac cagtagcacc attaccatta 4740  
aaggccgg aaacgtcacc aatgaaacca tcgatagcag caccgtaatc agtagcgaca 4800  
gaatcaagtt tgcctttagc gtcagactgt agcgcgtttt catcggcatt ttcggtcata 4860  
gcccccttat tagcgtttgc catcttttca taatcaaat caccggaacc agagccacca 4920  
ccggaaccgc ctccctcaga gccgccacc tcagaaccgc caccctcaga gccaccacc 4980  
tcagagccgc caccagaacc accaccagag ccgcccgcag cattgacagg aggcccgatc 5040  
tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag tttgcgcgt atattttgtt 5100  
ttctatcgcg tattaaatgt ataattgcgg gactcctaata ataaaaacc atctcataaa 5160  
taacgtcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg taattcaaca gaaattatat 5220  
gataatcatc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag aaactttatt gccaaatgtt 5280  
tgaacgatcg gggatcatcc ggggtctgtg cggaactcc acgaaaatat ccgaacgcag 5340  
caagatatcg cgggtgcatct cgggtcttgcc tgggcagtcg ccgcccgcgc cgttgatgtg 5400  
gacgcggggc ccgatcatat tgcgctcag gatcggtggc ttgtgcttgt cggccgttgc 5460  
tgtcgtaatg atatcggcac cttcgaccgc ctgttccgca gagatcccg gggcgaagaa 5520  
tccagcatg agatccccgc gctggaggat catccagccg gcgtcccga aaacgattcc 5580  
aagcccaac ctttcataga aggcggcggg ggaatcgaat tctcgatg gcagggttggg 5640  
cgtcgcttgg tcggtcattt cgaaccccg agtcccgcgc agaagaactc gtcaagaagg 5700  
cgatagaagg cgatgcgctg cgaatcggga gcggcgatac cgtaaagcac gaggaagcgg 5760  
tcagcccatc cgccgccaag ctcttcagca atatcacggg tagccaacgc tatgtcctga 5820  
tagcggtccg ccacaccag ccggccacag tcgatgaatc cagaaaagcg gccattttcc 5880  
accatgatat tcggcaagca ggcacgcca tgggtcacga cgagatcatc gccgtcgggc 5940  
atgcgcgcct tgagcctggc gaacagttcg gctggcgcca gcccctgatg ctcttcgtcc 6000  
agatcatcct gatcgacaag accggcttcc atccgagtac gtgctcgctc gatgcgatgt 6060  
ttcgcttggg ggtcgaatgg gcaggtagcc ggatcaagcg tatgcagccg ccgcattgca 6120  
tcagccatga tggatacttt ctcggcagga gcaaggtag atgacaggag atcctgcccc 6180  
ggcacttcgc ccaatagcag ccagtcctt cccgcttcag tgacaacgtc gagcacagct 6240  
gcgcaaggaa cggccgtcgt ggccagccac gatagccgcg ctgcctcgct ctgcagttca 6300  
ttcagggcac cggacaggtc ggtcttgaca aaaagaaccg ggccgcccctg cgctgacagc 6360  
cggaacacgg cggcatcaga gcagccgatt gtctgttggt ccagtcata gccgaatagc 6420



ctctccaccc aagcggccgg agaacctgcg tgcaatccat cttgttcaat catgcgaaac 6480  
gatccagatc cgggtgcagat tatttggatt gagagtgaat atgagactct aattggatac 6540  
cgaggggaat ttatggaacg tcagtggagc atttttgaca agaaatattt gctagctgat 6600  
agtgacctta ggcgactttt gaacgcgcaa taatggtttc tgacgtatgt gcttagctca 6660  
ttaaactcca gaaacccgcg gctgagtggc tccttcaacg ttgcggttct gtcagttcca 6720  
aacgtaaaac ggcttgtccc gcgtcatcgg cgggggtcat aacgtgactc ccttaattct 6780  
ccgctcatga tcagattgtc gtttcccgcc ttcagtttaa actatcagtg tttgacagga 6840  
tatattggcg ggtaaaccta agagaaaaga gcgtttatta gaataatcgg atatttaaaa 6900  
gggcgtagaa aggtttatcc gttcgtccat ttgtatgtgc atgccaacca cagggttccc 6960  
cagatctggc gccggccagc gagacgagca agattggccg ccgcccgaac cgatccgaca 7020  
gcgcgcccag cacaggtgcg caggcaaatt gcaccaacgc atacagcgcc agcagaatgc 7080  
catagtgggc ggtgacgtcg ttcgagtga ccagatcgcg caggaggccc ggcagcaccg 7140  
gcataatcag gccgatgccc acagcgtcga gcgcgacagt gtcagaatt acgatcaggg 7200  
atgttggg tttcacgtct ggcctccgga ccagcctccg ctgggtccgat tgaacgcgcg 7260  
gattctttat cactgataag ttggtggaca tattatgttt atcagtgata aagtgtcaag 7320  
catgacaaag ttgcagccga atacagtgat ccgtgccgccc ctggacctgt tgaacgaggt 7380  
cggcgtagac ggtctgacga cacgcaaact ggcggaacgg ttgggggttc agcagccggc 7440  
gctttactgg cacttcagga acaagcgggc gctgctcgac gcactggccg aagccatgct 7500  
ggcggagaat catacgcat cgggtgccgag agccgacgac gactggcgct catttctgat 7560  
cgggaatgcc cgcagcttca ggcaggcgct gctcgctac cgcgatggcg cgcgcacca 7620  
tgccggcacg cgaccgggcg caccgcagat ggaaacggcc gacgcgcagc ttcgcttcc 7680  
ctgcgaggcg ggtttttcgg ccgggggacg cgtcaatgcg ctgatgacaa tcagctactt 7740  
cactgttggg gccgtgcttg aggagcaggc cggcgacagc gatgccggcg agcgcggcgg 7800  
cacggttga caggctccgc tctcgccgct gttgcgggccc gcgatagacg ccttcgacga 7860  
agccggtccg gacgcagcgt tcgagcaggg actcgcggtg attgtcgatg gattggcgaa 7920  
aaggaggctc gttgtcagga acgttgaagg accgagaaag ggtgacgatt gatcaggacc 7980  
ctgccggag cgcaaccac tcaactacagc agagccatgt agacaacatc ccctccccct 8040  
tccaccgcg tcagacgccc gtagcagccc gctacgggct ttttcatgcc ctgccctagc 8100  
gtccaagcct cacggccgcg ctcggcctct ctggcgccct tctggcgctc ttccgcttcc 8160  
tcgctcactg actcgctgcg ctcggctcgtt cggctgcggc gagcgggtatc agctcactca 8220  
aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca 8280  
aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgctg tgctggcggt tttccatagg 8340  
ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg gcgaaacccg 8400  
acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgctgcg ctctcctgtt 8460  
ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcggaag cgtggcgctt 8520  
ttccgctgca taacctgct tcggggtoat tatagcgatt ttttcggtat atccatcctt 8580  
tttcgcacga tatacaggat tttgccaaag ggttcgtgta gactttcctt ggtgtatcca 8640  
acggcgctcag ccgggcagga taggtgaagt aggccaccc gcgagcgggt gttccttctt 8700  
cactgtccct tattegcacc tggcggtgct caacgggaat cctgctctgc gaggctggcc 8760  
ggctaccgccc ggcgtaacag atgagggcaa gcggatggct gatgaaacca agccaaccag 8820  
gaagggcagc ccacctatca aggtgtactg ccttcagac gaacgaagag cgattgagga 8880



aaaggcggcg gcggccggca tgagcctgtc ggcctacctg ctggccgctcg gccagggcta 8940  
 caaatcacg ggcgtcgtgg actatgagca cgteccgag ctggcccga tcaatggcga 9000  
 cctggggcgc ctggggcgcc tgctgaaact ctggctcacc gacgacccgc gcacggcgcg 9060  
 gttcggatgat gccacgatcc tcgcccgtgt ggcgaagatc gaagagaagc aggacgagct 9120  
 tggcaaggtc atgatgggcg tggtcgccc gagggcagag ccatgacttt tttagccgct 9180  
 aaaacggccg ggggggtgcgc gtgattgcc aagcagctcc catgcgctcc atcaagaaga 9240  
 gcgacttcgc ggagctggtg aagtacatca ccgacgagca aggcaagacc gagcgccctt 9300  
 gcgacgctca ccgggctggt tgccctcgcc gctgggctgg cggccgtcta tggccctgca 9360  
 aacgcgccag aaacgccgtc gaagccgtgt gcgagacacc gcggccgccg gcgttgtgga 9420  
 tacctcgccg aaaacttggc cctcactgac agatgagggg cggacgttga cacttgaggg 9480  
 gccgactcac ccggcgccgc gttgacagat gaggggcagg ctcgatttcg gccggcgacg 9540  
 tggagctggc cagcctcgca aatcggcgaa aacgcctgat tttacgcgag tttccacag 9600  
 atgatgtgga caagcctggg gataagtgc ctgcggtatt gacacttgag gggcgcgact 9660  
 tgacagat gagggcgcg atccttgaca cttgaggggc agagtgtga cagatgaggg 9720  
 gcgcacctat tgacatttga ggggtgtcc acaggcagaa aatccagcat ttgcaaggg 9780  
 ttccgcccg ttttcggcca ccgctaacct gtcttttaac ctgcttttaa accaatattt 9840  
 ataaaccttg tttttaacca gggctgcgcc ctgtgcgctg gaccgcgcac gccgaagggg 9900  
 ggtgcccccc cttctcgaa cctcccggcc cgctaaccgc ggcctcccat cccccagg 9960  
 gctgcgcccc tcggccgca acggcctcac ccaaaaaatg gcagcgctgg cagtccttgc 10020  
 cattgccggg atcggggcag taacgggatg ggcgatcagc ccgagcgca cggccggaag 10080  
 cattgacgtg ccgaggtgc tggcatcgac attcagcgac caggtgccgg gcagtgaggg 10140  
 cggcgggcctg ggtggcgcc tgcccttcac ttcggccgtc ggggcattca cggacttcac 10200  
 ggcggggccc gcaattttta ccttgggcat tcttggcata gtggtcgcg gtgcccgtgt 10260  
 cgtgttcggg ggtgcgataa acccagcgaa ccatttgagg tgataggtaa gattataccg 10320  
 aggtatgaaa acgagaattg gacctttaca gaattactct atgaagcgcc atatttataa 10380  
 agctaccaag acgaagagga tgaagaggat gaggaggcag attgccttga atatattgac 10440  
 taaactgata agataatata tcttttatat agaagatc gccgtatgta aggatttcag 10500  
 gggcaaggc ataggcagcg cgcttatcaa tatatctata gaatgggcaa agcataaaaa 10560  
 cttgcatgga ctaatgcttg aaaccagga caataacctt atagcttgta aattctatca 10620  
 taattgggta atgactccaa cttattgata gtgttttatg ttcagataat gcccgatgac 10680  
 tttgtcatgc agctccaccg attttgagaa cgacagcgac ttccgtccca gccgtgccag 10740  
 gtgctgcctc agattcaggt tatgcgctc aattcgctgc gtatatcgct tgctgattac 10800  
 gtgcagcttt cccttcaggc gggattcata cagcggccag ccatccgtca tccatatac 10860  
 caggtcaaag ggtgacagca ggctcataag acgcccagc gtcgccatag tgcgttcacc 10920  
 gaatacgtgc gcaacaaccg tcttcgggag actgtcatac gcgtaaaaca gccagcgctg 10980  
 gcgcgattta gccccgacat agccccactg ttcgtccatt tccgcgcaga cgatgacgtc 11040  
 actgcccggc tgtatgcgcg aggttaccga ctgcggcctg agttttttaa gtgacgtaaa 11100  
 atcgtgttga ggccaacgcc cataatgcgg gctgttgccc ggcattcaac gccattcatg 11160  
 gccatatcaa tgattttctg gtgcgtaccg ggttgagaag cgggtgaagt gaactgcagt 11220  
 tgccatgttt tacggcagtg agagcagaga tagcgtgat gtccggcggt gcttttgccg 11280  
 ttacgcacca cccgctcagt agctgaacag gagggacagc tgatagacac agaagccact 11340



ggagcacctc aaaaacacca tcatacacta aatcagtaag ttggcagcat caccataat. 11400  
tgtggtttca aaatcggctc cgtcgatact atgtttatacg ccaactttga aaacaacttt 11460  
gaaaaagctg ttttctggta ttttaagggtt tagaatgcaa ggaacagtga attggagttc 11520  
gtcttggtat aattagcttc ttgggggtatc tttaaatact gtagaaaaga ggaaggaaat 11580  
aataaatggc taaaatgaga atatcaccgg aattgaaaaa actgatcgaa aaataccgct 11640  
gcgtaaaaga tacggaagga atgtctcctg ctaagggtata taagctgggtg ggagaaaatg 11700  
aaaacctata tttaaaaatg acggacagcc ggtataaagg gaccacctat gatgtggaac 11760  
gggaaaagga catgatgcta tggctggaag gaaagctgcc tgttccaaag gtcctgcaact 11820  
ttgaacggca tgatggctgg agcaatctgc tcatgagtga ggccgatggc gtcctttgct 11880  
cggaagagta tgaagatgaa caaagccctg aaaagattat cgagctgtat gcggagtgca 11940  
tcaggctctt tcactccatc gacatatcgg attgtcccta tacgaatagc ttagacagcc 12000  
gcttagccga attggattac ttactgaata acgatctggc cgatgtggat tgcgaaaact 12060  
gggaagaaga cactccattt aaagatccgc gcgagctgta tgatttttta aagacggaaa 12120  
cccggaaga ggaacttgtc ttttcccacg gcgacctggg agacagcaac atctttgtga 12180  
gatggcaa agtaagtggc tttattgatc ttgggagaag cggcagggcg gacaagtgg 12240  
atgacattgc cttctgcgtc cggtcgatca gggaggatat cggggaagaa cagtatgtcg 12300  
agctattttt tgacttactg gggatcaagc ctgattggga gaaaataaaa tattatattt 12360  
tactggatga attgttttag tacctagatg tggcgcaacg atgccggcg caagcaggag 12420  
cgcaccgact tcttccgcat caagtgtttt ggctctcagg ccgaggccca cggcaagtat 12480  
ttgggcaagg ggtcgtgggt attcgtgcag ggcaagattc ggaataccaa gtacgagaag 12540  
gacggccaga cggctctacg gaccgacttc attgccgata aggtggatta tctggacacc 12600  
aaggcaccag gcgggtcaaa tcaggaataa gggcacattg cccggcgctg agtcggggca 12660  
atcccgaag gagggatgaat gaatcggacg tttgaccgga aggcatacag gcaagaactg 12720  
atcgacgcgg ggttttccgc cgaggatgcc gaaaccatcg caagccgcac cgtcatgcgt 12780  
gcgccccgcg aaaccttcca gtccgtcggc tcgatgggtc agcaagctac ggccaagatc 12840  
gagcgcgaca gcgtgcaact ggctccccct gccctgcccg cgccatcggc cgccgtggag 12900  
ggttcgcgtc gtctcgaaca ggaggcggca ggtttggcga agtcgatgac catcgacacg 12960  
gaggaacta tgacgaccaa gaagcgaaaa accgcggcg aggacctggc aaaacaggtc 13020  
agcgaggcca agcaggccgc gttgctgaaa cacacgaagc agcagatcaa ggaaatgcag 13080  
ctttccttgt tcgatattgc gccgtggccg gacacgatgc gagcgatgcc aaacgacacg 13140  
gcccgtctct ccctgttcac cacgcgcaac aagaaaatcc cgcgcgaggc gctgcaaaac 13200  
aaggctattt tccacgtcaa caaggacgtg aagatcacct acaccggcgt cgagctgcgg 13260  
gccgacgatg acgaactggt gtggcagcag gtgttgagat acgcgaagcg caccctatc 13320  
ggcgagccga tcaccttcac gttctacgag ctttgccagg acctgggctg gtcgatcaat 13380  
ggccggtatt acacgaaggc cgaggaatgc ctgtcgcgcc tacaggcgac ggcgatgggc 13440  
ttcacgtccg accgcgttgg gcacctggaa tcggtgtcgc tgctgcaccg cttccgcgtc 13500  
ctggaccgtg gcaagaaaac gtcccgttgc caggtcctga tcgacgagga aatcgtcgtg 13560  
ctgtttgctg gcgaccacta cacgaaattc atatgggaga agtaccgcaa gctgtcgcgg 13620  
acggccccgac ggatgttcga ctatttcagc tcgcaccggg agccgtaccc gctcaagctg 13680  
gaaaccttcc gcctcatgtg cggatcggat tccaccgcg tgaagaagtg gcgcgagcag 13740  
gtcggcgaag cctgcgaaga gttgcgaggc agcggcctgg tggaacacgc ctgggtcaat 13800



BASF AG  
BASF NAE 579/03

09/81

4. September 2003

gatgacctgg tgcattgcaa acgctagggc cttgtgggggt cagttccggc tgggggttca 13860  
gcagccagcg ctttactggc atttcaggaa caagcgggca ctgctcgacg cacttgcttc 13920  
gctcagtatc gctcgggacg cacggcgcg cttacgaact gccgataaac agaggattaa 13980  
aattgacaat tgtgattaag gctcagattc gacggccttg agcggccgac gtgcaggatt 14040  
tccgcgagat ccgattgtcg gccctgaaga aagctccaga gatgttcggg tccgtttacg 14100  
agcacgagga gaaaaagccc atggaggcgt tcgctgaacg gttgcgagat gccgtggcat 14160  
tcggcgcccta catcgacggc gagatcattg ggctgtcggg cttcaaacag gaggacggcc 14220  
ccaaggacgc tcacaaggcg catctgtccg gcgttttcgt ggagcccgaa cagcgaggcc 14280  
gaggggtcgc cggatgtcg ctgcgggcgt tgccggcggg tttattgtc gtgatgatcg 14340  
tccgacagat tccaacggga atctgggtga tgcgcattc catcctcggc gcacttaata 14400  
tttcgctatt ctggagcttg ttgtttatct cggctaccg cctgccgggc ggggtcgcgg 14460  
cgacggtagg cgctgtgcag ccgctgatgg tcgtgttcat ctctgccgt ctgctaggta 14520  
gcccgatacg attgatggcg gtccctgggg ctatttgcg aactgcgggc gtggcgctgt 14580  
gtgttgac accaaacgca gcgctagatc ctgtcggcg cgacgcgggc ctggcggggg 14640  
gtttccat ggcgttcgga accgtgctga cccgcaagt gcaacctccc gtgcctctgc 14700  
tcacctttac cgcctggcaa ctggcgccg gaggacttct gctcgttcca gtagctttag 14760  
tgtttgatcc gccaatcccg atgcctacag gaaccaatgt tctcggcctg gcgtggctcg 14820  
gcctgatcgg agcgggttta acctacttcc tttggttccg ggggatctcg cgactcgaac 14880  
ctacagttgt ttccctactg ggctttctca gcccagatc tggggtcgat cagccgggga 14940  
tgcacagggc cgacagtcgg aacttcgggt ccccgacctg taccattcgg tgagcaatgg 15000  
ataggggagt tgatatcgtc aacgttcaact tctaaagaaa tagcgccact cagcttctc 15060  
agcggcttta tccagcgatt tcctattatg tcggcatagt tctcaagatc gacagcctgt 15120  
cacggttaag cgagaaatga ataagaaggc tgataattcg gatctctgcg agggagatga 15180  
tatttgatca caggcagcaa cgctctgtca tcgttacaat caacatgcta ccctccgga 15240  
gatcatccgt gtttcaaacc cggcagctta gttgccgttc ttccgaatag catcggtaac 15300  
atgagcaaag tctgcgcct tacaacggct ctcccgctga cgccgtccc gactgatggg 15360  
ctgcctgtat cgagtgggta tttgtgccc agctgccggg cggggagctg ttggctgggt 15420  
ctggcagga tatattgtgg tgtaaacaaa ttgacgetta gacaacttaa taacacattg 15480  
cggacgtttt taatgtactg ggggtggttt tcttttcacc agtgagacgg gcaacagctg 15540  
attgcccttc accgcctggc cctgagagag ttgcagcaag cgggtccacg tggtttgccc 15600  
cagcaggega aaatcctgtt tgatgggtgt tccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca 15660  
aaagaatagc ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta 15720  
aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggccacta 15780  
cgtgaacat caccctaatc aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg 15840  
aaccctaaag ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga 15900  
aaggaaggga agaaagcgaa aggagcgggc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg 15960  
gcgatcgggt cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaaggggat gtgctgcaag 16020  
gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag 16080  
tgaattcgag ctcggtaccc ggg 16103



<210> 4

<211> 15739

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Vector

<400> 4

gatcttttcga cactgaaata cgtcgagcct gtcctcgcttg gaagcggcga ggagcctcgt 60  
cctgtcacia ctaccaacat ggagtacgat aagggccagt tccgccagct cattaagagc 120  
cagttcatgg gcggtggcat gatggccgtc atgcatctgt acttcaagta caccaacgct 180  
cttctgatcc agtcgatcat ccgctgaagg cgttttcgaa tctgggttaag atccacgtct 240  
gggaagcc agcgactggg gacctccagc gtccctttta ggctgccaac agctttctca 300  
ccagggccca gcccaagacc gacaaggcct ccctccagaa cggcgagaag aactggaggg 360  
gtgggtgtcaa ggaggagtaa gctccttatt gaagtcggag gacggagcgg tgtcaagagg 420  
atattcttcg actctgtatt atagataaga tgatgaggaa ttggaggtag catagcttca 480  
tttggtattg ctttccaggc tgagactcta gcttggagca tagagggtcc tttggctttc 540  
aatattctca agtatctcga gtttgaactt attccctgtg aaccttttat tcaccaatga 600  
gcattggaat gaacatgaat ctgaggactg caatcgccat gaggttttcg aaatacatcc 660  
ggatgtcgaa ggcttggggc acctgcgttg gttgaattta gaacgtggca ctattgatca 720  
tccgatagct ctgcaaaggg cgttgcacia tgcaagtcaa acgttgctag cagttccagg 780  
tggaatgtta tgatgagcat tgtattaaat caggagatat agcatgatct ctagttagct 840  
caccacaaaa gtcagacggc gtaaccaaaa gtcacacaac acaagctgta aggatttcgg 900  
cacggctacg gaagacggag aagccacctt cagtggactc gaggaccatt taattctatt 960  
tgtgtttgat cgagacctaa tacagccctt acaacgacca tcaaagtcgt atagctacca 1020  
tgaggaagt ggactcaaat cgacttcagc aacatctcct ggataaactt taagcctaaa 1080  
ctacacagaa taagataggt ggagagctta taccgagctc ccaaactctgt ccagatcatg 1140  
gttgaccggt gcctggatct tcctatagaa tcctccttat tcgttgacct agctgattct 1200  
ggagtgaacc agagggtcat gacttgagcc taaaatccgc cgcctccacc attttagtaa 1260  
aaatgtgacg aactcgtgag ctctgtacag tgaccgggtga ctctttcttg catgcggaga 1320  
gacggacgga cgcagagaga agggctgagt aataagccac tggccagaca gctctggcgg 1380  
ctctgagggt cagtggatga ttattaatcc gggaccggcc gccctccgc cccgaagtgg 1440  
aaaggctggt gtgcccctcg ttgaccaaga atctattgca tcacggaga atatggagct 1500  
tcacgaatc accggcagta agcgaaggag aatgtgaagc caggggtgta tagcgcggc 1560  
cgaaatagca tgccattaac ctaggtacag aagtccaatt gcttccgac tggtaaaaga 1620  
ttcacgagat agtaccttct ccgaagtagg tagagcgagt acccggcgcg taagctccct 1680  
aattggccca tccggcatct gtagggcgtc caaatatcgt gcctctcctg ctttgccgg 1740  
tgtatgaaac cggaaaggcc gtcaggagc tggccagcgg cgcagaccgg gaacacaagc 1800  
tggcagtcga cccatccggt gctctgcact cgacctgctg aggtccctca gtccctggta 1860  
ggcagctttg ccccgctctgt ccgcccgggtg tgtcggcggg gttgacaagg tcgttgcgctc 1920



agccaacat ttgttgccat attttcctgc tctcccacc agctgctctt ttcttttctc 1980  
tttcttttcc catcttcagt atattcatct tcccatccaa gaacctttat ttcccctaag 2040  
taagtacttt gctacatcca tactccatcc tcccatccc ttattccttt gaacctttca 2100  
gttcgagctt tcccacttca tcgcagcttg actaacagct accccgcttg agcagacatc 2160  
accatgcctg aactcaccgc gacgtctgtc gagaagtttc tgatcgaaaa gttcgacagc 2220  
gtctccgacc tgatgcagct ctccgagggc gaagaatctc gtgctttcag cttcgatgta 2280  
ggagggcgctg gatatgtcct gcgggtaaat agctgcgcgc atggtttcta caaagatcgt 2340  
tatgtttatc ggcactttgc atcggccgcg ctcccgattc cggaagtgtc tgacattggg 2400  
gaattcagcg agagcctgac ctattgcac tcccgcctg cacagggtgt caggttgcaa 2460  
gacctgcctg aaaccgaact gcccgctgtt ctgcagccgg tcgcggaggc catggatgcg 2520  
atcgctgcgg ccgatcttag ccagacgagc gggttcggcc cattcggacc gcaaggaatc 2580  
ggtcaataca ctacatggcg tgatttcata tgcgcgattg ctgatcccca tgtgtatcac 2640  
tggaactg tgatggacga caccgtcagt gcgtccgtcg cgcaggctct cgatgagctg 2700  
gctttggg ccgaggactg cccgaagtc cggcacctcg tgcacgcgga ttccggctcc 2760  
acaatgtcc tgacggacaa tggccgcata acagcggta ttgactggag cgaggcgatg 2820  
ttcggggatt cccaatacga ggtcgccaac atcttcttct ggaggccgtg gttggcttgt 2880  
atggagcagc agacgcgcta cttcgagcgg aggcattccg agcttgagg atcgccgcgg 2940  
ctccggcgct atatgtccg cattggctct gaccaactct atcagagctt ggttgacggc 3000  
aatttcgatg atgcagcttg ggcgcagggt cgatgcgacg caatcgccg atccggagcc 3060  
gggactgtcg ggcgtacaca aatcgccgc agaagcgcgg ccgtctggac cgatggctgt 3120  
gtagaagtac tcgccgatag tggaaaccga cgcgccagca ctcgccgag ggcaaaggaa 3180  
tagagtagat gccgaccgcg ggcgcgatcc acttaacgtt actgaaatca tcaaacagct 3240  
tgacgaatct ggcataaaga tcgttggtgt cgatgtcagc tccggagttg agacaaatgg 3300  
tggtcaggat ctcgataaga tacgttcatt tgtccaagca gcaaagagt ccttctagt 3360  
atttaatagc tccatgtcaa caagaataaa acgcgttttc ggggtttacct cttccagata 3420  
cagctcatct gcaatgcatt aatgcattga ctgcaacct gtaacgcctt ncaggctccg 3480  
cgaagagaa gaatagctta gcagagctat ttctattttc gggagacgag atcaagcaga 3540  
caacggctg tcaagagacc tacgagactg aggaatccgc tcttggtcc acgcgactat 3600  
atatttgtct ctaattgtac ttgacatgc tctcttctt tactctgata gcttgactat 3660  
gaaaattccg tcaccagcnc ctgggttcgc aaagataatt gcatgtttct tccttgaact 3720  
ctcaagccta caggacacac attcatcgta ggtataaacc tcgaaatcan ttctactaa 3780  
gatggtatac aatagtaacc atgcatggtt gctagtga tgctccgtaa caccataac 3840  
gccggccgaa acttttttac aactctcta tgagtcgttt acccagaatg cacaggatca 3900  
cttggttaga ggtaatcctt cttcttagct agaagtcctc gtgtactgtg taagcgcca 3960  
ctccacatct ccaatcgacc tgcaggcatg caagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt 4020  
ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa 4080  
agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgct ttgcgtcac 4140  
tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg 4200  
cggggagagg cggtttgctg attgggcaa agacaaaagg gcgacattca accgattgag 4260  
ggagggaagg taaatattga cggaaattat tcattaaagg tgaattatca ccgtcaccga 4320  
cttgagccat ttgggaatta gagccagcaa aatcaccagt agcaccatta ccattagcaa 4380



ggcccgaaac	gtcaccaatg	aaaccatcga	tagcagcacc	gtaatcagta	gcgacagaat	4440
caagtttgcc	tttagcgta	gactgtagcg	cgttttcacc	ggcattttcg	gtcatagccc	4500
ccttattagc	gtttgccatc	ttttcataat	câaaatcacc	ggaaccagag	ccaccaccgg	4560
aaccgcctcc	ctcagagccg	ccaccctcag	aaccgcccacc	ctcagagcca	ccaccctcag	4620
agccgcccacc	agaaccacca	ccagagccgc	cgccagcatt	gacaggaggc	ccgatctagt	4680
aacatagatg	acaccgcgcg	cgataattta	tcctagtttg	cgcgctatat	tttgttttct	4740
atcgcgat	aaatgtataa	ttgcgggact	ctaatacata	aaaccatct	cataaataac	4800
gtcatgcatt	acatgttaat	tattacatgc	ttaacgtaat	tcaacagaaa	ttatatgata	4860
atcatcgcaa	gaccggcaac	aggattcaat	cttaagaaac	tttattgcca	aatgtttgaa	4920
cgatcgggga	tcattccgggt	ctgtggcggg	aactccacga	aaatatccga	acgcagcaag	4980
atatcgcggt	gcattctcggt	cttgccctggg	cagtcgcccgc	cgacgcccgt	gatgtggacg	5040
ccggggcccga	tcattattgtc	gctcaggatc	gtggcggttg	gcttgtcggc	cgttgctgtc	5100
gtaatgatat	cggcaccttc	gaccgcctgt	tcgcgagaga	tcccggtggc	gaagaactcc	5160
catgagat	ccccgcgctg	gaggatcacc	cagccggcgt	cccgaaaaac	gattccgaag	5220
ccaaccttt	catagaaggc	ggcggtggaa	tcgaaatctc	gtgatggcag	gttggggcgtc	5280
gcttggtcgg	tcatttcgaa	ccccagagtc	ccgctcagaa	gaactcgtca	agaaggcgat	5340
agaaggcgat	gcgctgcgaa	tcgggagcgg	cgataaccgta	aagcacgagg	aagcggtcag	5400
cccattcgcc	gccaagctct	tcagcaatat	cacgggtagc	caacgctatg	tcctgatagc	5460
ggtccgccac	accagccgg	ccacagtcga	tgaatccaga	aaagcgcca	ttttccacca	5520
tgatattcgg	caagcaggca	tcgccatggg	tcacgacgag	atcatcgccg	tcgggcatgc	5580
gcgccttgag	cctggcgaa	agttcggtcg	gcgcgagccc	ctgatgctct	tcgtccagat	5640
catcctgatc	gacaagaccg	gcttcacatc	gagtacgtgc	tcgctcgatg	cgatgtttcg	5700
cttggtggtc	gaatgggcag	gtagccggat	caagcgtatg	cagccgcccgc	attgcatcag	5760
ccatgatgga	tactttctcg	gcaggagcaa	ggtgagatga	caggagatcc	tgccccggca	5820
cttcgcccga	tagcagccag	tccttccccg	cttcagtgac	aacgtcgagc	acagctgcgc	5880
aaggaaacgc	cgtcgtggcc	agccacgata	gccgcgctgc	ctcgctcctgc	agttcattca	5940
ggcaccgga	caggtcggtc	ttgacaaaaa	gaaccggggc	cccctgcgct	gacagccgga	6000
ccacggcggc	atcagagcag	ccgattgtct	gttgtgcccc	gtcatagccg	aatagcctct	6060
ccaccaagc	ggccggagaa	cctgcgtgca	atccatcttg	ttcaatcatg	cgaaacgatc	6120
cagatccggt	gcagattatt	tggattgaga	gtgaatatga	gactctaatt	ggataccgag	6180
gggaatttat	ggaacgtcag	tggagcattt	ttgacaagaa	atatttgcta	gctgatagtg	6240
accttaggcg	acttttgaac	gcgcaataat	ggtttctgac	gtatgtgctt	agctcattaa	6300
actccagaaa	cccgcggctg	agtggctcct	tcaacgttgc	ggttctgtca	gttccaaacg	6360
taaaacggct	tgtcccgcgt	catcgggcgg	ggtcataacg	tgactccctt	aattctccgc	6420
tcattgatcag	attgtcgttt	cccgccttca	gtttaaacta	tcagtgtttg	acaggatata	6480
ttggcgggta	aacctaaag	aaaagagcgt	ttattagaat	aatcggatat	ttaaaagggc	6540
gtgaaaagg	ttatccgttc	gtccatttgt	atgtgcatgc	caaccacagg	gttccccaga	6600
tctggcgccg	gccagcgaga	cgagcaagat	tggccgccgc	ccgaaacgat	ccgacagcgc	6660
gcccagcaca	ggtgcgcagg	caaattgcac	caacgcatac	agcgccagca	gaatgccata	6720
gtgggcgggtg	acgtcgttcg	agtgaaccag	atcgcgcagg	aggcccggca	gcaccggcat	6780
aatcaggccg	atgccgacag	cgtcgagcgc	gacagtgtct	agaattacga	tcagggggtat	6840



gttgggtttc acgtctggcc tccggaccag cctccgctgg tccgattgaa cgcgcggatt 6900  
ctttatcact gataagttgg tggacatatt atgtttatca gtgataaagt gtcaagcatg 6960  
acaaagttgc agcgaatac agtgatccgt gccgccctgg acctgttgaa cgaggctcgc 7020  
gtagacggtc tgacgacacg caaactggcg gaacggttgg gggttcagca gccggcgctt 7080  
tactggcact tcaggaacaa gcgggcgctg ctcgacgcac tggccgaagc catgctggcg 7140  
gagaatcata cgcattcggg gccgagagcc gacgacgact ggcgctcatt tctgatcggg 7200  
aatgcccgcg gcttcaggca ggcgctgctc gcctaccgcg atggcgcgcg catccatgcc 7260  
ggcacgcgac cggggcgacc gcagatggaa acggccgcag cgcagcttcg ctctctctgc 7320

gaggcgggtt tttcggccgg ggacgcctgc aatgcgctga tgacaatcag ctacttcact 7380  
gttggggccg tgcttgagga gcaggccggc gacagcgatg ccggcgagcg cggcggcacc 7440  
gttgaacagg ctccgctctc gccgctgttg cgggcgcgca tagacgcctt cgacgaagcc 7500  
ggtccggacg cagcgttcga gcagggactc gcggtgattg tcgatggatt ggcgaaaagg 7560  
gctcgttg tcaggaacgt tgaaggaccg agaaaggggtg acgattgatc aggaccgctg 7620  
ccggagcgca acccactcac tacagcagag ccatgtagac aacatccctt ccccttttc 7680  
accgcgtcag acgcccgtag cagcccgcct cgggcttttt catgccctgc cctagcgtcc 7740  
aagcctcacg gccgcgctcg gcctctctgg cggccttctg gcgctcttcc gcttctctgc 7800  
tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg 7860  
cggtaatac gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag 7920  
gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgcg ggcgtttttc cataggctcc 7980  
gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcacag 8040  
gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga 8100  
ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgcttttcc 8160  
gctgcataac cctgcttcgg ggtcattata gcgatttttt cggatatatc atcctttttc 8220  
gcacgatata caggattttg ccaaaggggt cgtgtagact ttcccttggtg tatccaacgg 8280  
cgtcagccgg gcaggatagg tgaagtaggc ccaccgcgga gcgggtgttc cttcttctact 8340  
ctcccttatt cgcacctggc ggtgctcaac gggaatcctg ctctgcgagg ctggccgggt 8400  
accgcccggc taacagatga gggcaagcgg atggctgatg aaaccaagcc aaccaggaag 8460  
ggcagcccac ctatcaaggt gtactgcctt ccagacgaac gaagagcgat tgaggaaaag 8520  
gcggcggcgg ccggcatgag cctgtcggcc tacctgctgg ccgtcggcca gggctacaaa 8580  
atcacgggcy tcgtggacta tgagcacgto cgcgagctgg cccgcatcaa tggcgacctg 8640  
ggccgcctgg gcggcctgct gaaactctgg ctaccgcagc acccgcgcac ggcgcggttc 8700  
ggtgatgcca cgatcctcgc cctgctggcg aagatcgaag agaagcagga cgagcttggc 8760  
aaggtcatga tgggcgtggg ccgcccagagg gcagagccat gactttttta gccgctaaaa 8820  
cggccggggg gtgcgcgtga ttgccaaagc cgtcccatg cgctccatca agaagagcga 8880  
cttcgcggag ctggtgaagt acatcaccca cgagcaaggc aagaccgagc gcctttgcga 8940  
cgctcacccg gctggttgcc ctgcgcgctg ggctggcgcc cgtctatggc cctgcaaacc 9000  
cgccagaaac gccgtcgaag ccgtgtgcga gacaccgcgg ccgcggcggt tgtggatacc 9060  
tcgcggaaaa cttggccctc actgacagat gaggggcgga cgttgacact tgaggggccc 9120  
actcacccgg cgcggcgctt acagatgagg ggcaggctcg atttcggccg gcgacgtgga 9180  
gctggccagc ctgcgaaatc ggcaaaaacg cctgatttta cgcgagtttc ccacagatga 9240



BASF AG  
BASF NAE 579/03

14/81

4. September 2003

tgtggacaag cctggggata agtgccttgc ggtattgaca cttgaggggc gcgactactg 9300  
acagatgagg ggcgcgatcc ttgacacttg aggggcagag tgctgacaga tgagggggcg 9360  
acctattgac atttgagggg ctgtccacag gcagaaaatc cagcatttgc aagggtttcc 9420  
gcccgttttt cggccaccgc taacctgtct ttttaacctgc ttttaaacca atatttataa 9480  
accttgtttt taaccagggc tgcgcccgtg gcgctgacc gcgcacgccg aaggggggtg 9540  
cccccccttc tcgaaccctc ccggcccgtc aacgcggggc tcccatcccc ccaggggctg 9600  
cgcccctcgg ccgcgaacgg cctcacccca aaaatggcag cgctggcagt cettgccatt 9660  
gccgggatcg gggcagtaac gggatgggag atcagcccga gcgcgacgcc cggaagcatt 9720  
gacgtgccgc aggtgctggc atcgacattc agcgaccagg tgccgggcag tgagggcggc 9780  
ggcctgggtg gggccttgc cttcacttcg gccgtcgggg cattcacgga cttcatggcg 9840  
gggcccggca tttttacctt gggcatttct ggcatagtgg tcgcggttgc cgtgctcgtg 9900  
ttcgggggtg cgataaacc agcgaacat ttgaggtgat aggtgaagatt ataccgaggt 9960  
atgaaaacga gaattggacc ttacagaat tactctatga agcgccatat ttaaaaagct 10020  
caagacga agaggatgaa gaggatgagg aggcagattg ctttgaatat attgacaata 10080  
cgataagat aatatatctt ttatatagaa gatatcgccg tatgtaagga tttcaggggg 10140  
caaggcatag gcagcgcgct tatcaatata tctatagaat gggcaaagca taaaaacttg 10200  
catggactaa tgcttgaac ccaggacaat aaccttatag cttgtaaatt ctatcataat 10260  
tgggtaatga ctccaactta ttgatagtgt tttatgttca gataatgcc gatgactttg 10320  
tcatgcagct ccaccgattt tgagaacgac agcgacttcc gtccagagccg tgccaggtgc 10380  
tgccctcagat tcaggttatg ccgctcaatt cgctgcgtat atcgcttgct gattacgtgc 10440  
agctttccct tcaggcggga ttcatacagc ggccagccat ccgtcatcca tatcaccagc 10500  
tcaaaggggtg acagcaggct cataagacgc ccagcgctc ccatagtgcg ttcaccgaat 10560  
acgtgcgcaa caaccgtctt ccggagactg tcatacgcgt aaaacagcca gcgctggcg 10620  
gatttagccc cgacatagcc ccaactgttcg tccatttccg cgacagcagat gacgtcactg 10680  
cccggctgta tgcgcgaggt taccgactgc ggcctgagtt ttttaagtga cgtaaaatcg 10740  
tgttgaggcc aacgcccata atgcggggtg ttgcccggca tccaacgcca ttcattggca 10800  
atcaatgat tttctggtgc gtaccgggtt gagaagcggg gtaagtgaac tgcagttgcc 10860  
tgtttttacg gcagtgagag cagagatagc gctgatgtcc ggcggtgctt ttgccgttac 10920  
gcaccacccc gtcagttagt gaacaggagg gacagctgat agacacagaa gccactggag 10980  
cacctcaaaa acaccatcat aactaaatc agtaagttgg cagcatcacc cataattgtg 11040  
gtttcaaaat cggctccgct gatactatgt tatacgccaa ctttgaaaac aactttgaaa 11100  
aagctgtttt ctggtattta aggttttaga atgcaaggaa cagtgaattg gagttcgtct 11160  
tgttataatt agcttcttgg ggtatcttta aatactgtag aaaagaggaa ggaaataata 11220  
aatggctaaa atgagaatat caccggaatt gaaaaactg atcgaaaaat accgctgcgt 11280  
aaaagatacg gaaggaaatg ctctgctaa ggtatataag ctggtgggag aaaatgaaaa 11340  
cctatattta aaaatgacgg acagccggt taaagggacc acctatgatg tggaacggga 11400  
aaaggacatg atgctatggc tggaaggaaa gctgcctgtt ccaaagggtc tgcaacttga 11460  
acggcatgat ggctggagca atctgctcat gagtggggc gatggcgctc tttgctcgga 11520  
agagtatgaa gatgaacaaa gccctgaaaa gattatcgag ctgtatgcgg agtgcacag 11580  
gctctttcac tccatcgaca tatcggttgc tccctatacg aatagcttag acagccgctt 11640  
agccgaattg gattacttac tgaataacga tctggccgat gtggattgcg aaaactggga 11700



BASF AG  
BASF NAE 579/03

05.08.2003

4. September 2003

agaagacact ccatttaaag atccgcgcga gctgtatgat tttttaaga cggaaaagcc 11760  
cgaagaggaa cttgtctttt ccacagcgga cctgggagac agcaacatct ttgtgaaaga 11820  
tggcaaagta agtggcttta ttgatcttgg gagaagcggc agggcggaca agtggtatga 11880  
cattgccttc tgcgtccggt cgatcaggga ggatctcggg gaagaacagt atgtcgagct 11940  
attttttgac ttactgggga tcaagcctga ttgggagaaa ataaaatatt atattttact 12000  
ggatgaattg ttttagtacc tagatgtggc gcaacgatgc cggcgacaag caggagcgca 12060  
ccgacttctt ccgcatcaag tgttttggct ctcaggccga ggcccaaggc aagtatttgg 12120  
gcaaggggtc gctggtattc gtgcaggga agattcggaa taccaagtac gagaaggacg 12180  
gccagacggt ctacgggacc gacttcattg ccgataaggt ggattatctg gacaccaagg 12240  
caccaggcgg gtcaaactcag gaataagggc acattgcccc ggcgtgagtc ggggcaatcc 12300  
cgcaaggagg gtgaatgaat cggacgtttg accggaaggc atacaggcaa gaactgatcg 12360  
acgcggggtt ttccgcccag gatgccgaaa ccatcgcaag ccgcaccgtc atgcgtgcgc 12420  
cccgcaaac cttccagtc gtcggctcga tggccagca agctacggcc aagatcgagc 12480  
gacagcgt gcaactggct cccctgccc tggccgcgc atcgccgcgc gtggagcgtt 12540  
gcgtcgtct cgaacaggag gcggcaggtt tggcgaagtc gatgaccatc gacacgcgag 12600  
gaactatgac gaccaagaag cgaaaaaccg ccggcgagga cctggcaaaa caggtcagcg 12660  
aggccaagca ggccgcgttg ctgaaacaca cgaagcagca gatcaaggaa atgcagcttt 12720  
ccttgttcga tattgcgccg tggccggaca cgatgcgagc gatgccaaac gacacggccc 12780  
gctctgccct gtccaccacg cgcaacaaga aaatcccgcg cgaggcgctg caaaacaagg 12840  
tcattttcca cgtcaacaag gacgtgaaga tcacctacac cggcgtcgag ctgcgggccg 12900  
acgatgacga actggtgtgg cagcaggtgt tggagtacgc gaagcgcacc cctatcggcg 12960  
agccgatcac cttcacgttc tacgagcttt gccaggacct gggctggtcg atcaatggcc 13020  
ggtattacac gaaggccgag gaatgcctgt cgcgcctaca ggcgacggcg atgggcttca 13080  
cgtccgaccg cgttgggcac ctggaatcgg tgtcgtgct gcaccgcttc cgcgtcctgg 13140  
accgtggcaa gaaaacgtcc cgttgccagg tcttgatcga cgaggaaatc gtcgtgctgt 13200  
ttgctggcga ccactacacg aaattcatat gggagaagta ccgcaagctg tcgccgacgg 13260  
cccgacggat gttcgactat ttcagctcgc accgggagcc gtaccgctc aagctggaaa 13320  
cttcgcct catgtcgga tcggattcca cccgcgtgaa gaagtggcg gagcaggtcg 13380  
gcgaagcctg cgaagagttg cgaggcagcg gcctggtgga acacgcctgg gtcaatgatg 13440  
acctggtgca ttgcaaacgc tagggccttg tggggtcagt tcdggctggg ggttcagcag 13500  
ccagcgcttt actggcattt caggaacaag cgggcactgc tcgacgcaact tgettcgctc 13560  
agtatcgctc gggacgcacg gcgcgtcta cgaactgccg ataaacagag gattaaaatt 13620  
gacaattgtg attaaggctc agattcgacg gcttggagcg gccgacgtgc aggatttccg 13680  
cgagatccga ttgtcggccc tgaagaaagc tccagagatg ttcgggtccg ttacgagca 13740  
cgaggagaaa aagcccatgg aggcgttcgc tgaacggtt cgagatgccg tggcattcgg 13800  
cgccatcac gacggcgaga tcattgggct gtcggtcttc aaacaggagg acggcccaa 13860  
ggacgctcac aaggcgcac tgtccggcgt tttcgtggag cccgaacagc gaggccgagg 13920  
ggtcgccggt atgctgctgc gggcgttgcc ggggggttta ttgctcgtga tgatcgtccg 13980  
acagattcca acgggaatct ggtggatgcg catcttcac ctcggcgcac ttaatatctc 14040  
gctattctgg agcttgttgt ttatttcggt ctaccgcctg ccgggcgggg tcgggcgac 14100  
ggtaggcgct gtgcagccgc tgatggtcgt gttcatctct gccgctctgc taggtagccc 14160



gatacgattg atggcgggtcc tgggggctat ttgcggaact gcgggcgtgg cgctgttggg 14220  
gttgacacca aacgcagcgc tagatcctgt cggcgctcgca gcgggcctgg cgggggcggt 14280  
ttccatggcg ttcggaaccg tgctgacccg caagtggcaa cctcccgctgc ctctgctcac 14340  
ctttaccgcc tggcaactgg cggccggagg acttctgctc gttccagtag ctttagtggt 14400  
tgatccgcca atcccgatgc ctacaggaac caatgttctc ggcctggcgt ggctcggcct 14460  
gatcggagcg ggtttaacct acttcctttg gttccggggg atctcgcgac tcgaacctac 14520  
agttgtttcc ttactgggct ttctcagccc cagatctggg gtcgatcagc cgggggatgca 14580  
tcaggccgac agtcggaact tcgggtcccc gacctgtacc attcgggtgag caatggatag 14640  
gggagttgat atcgtcaacg ttcacttcta aagaaatagc gccactcagc ttcctcagcg 14700  
gctttatcca gcgatttcct attatgtcgg catagtctc aagatcgaca gcctgtcacg 14760  
gttaagcgag aaatgaataa gaaggctgat aattcggatc tctgcgaggg agatgatatt 14820  
tgatcacagg cagcaacgct ctgtcatcgt tacaatcaac atgctaccct ccgcgagatc 14880  
atccgtgttt caaaccggc agcttagttg ccgttcttcc gaatagcatc ggtaacatga 14940  
aaagtctg ccgccttaca acggctctcc cgctgacgcc gtcccggact gatgggctgc 15000  
  
ctgtatcgag tggtgathtt gtgccgagct gccggtcggg gagctgttg ctggctgggtg 15060  
gcaggatata ttgtgggtgta aacaaattga cgcttagaca acttaataac acattgcgga 15120  
cgtttttaat gtactggggg ggtttttctt ttcaccagtg agacgggcaa cagctgattg 15180  
cccttcaccg cctggccctg agagagttgc agcaagcggg ccacgctggg ttgccccagc 15240  
aggcgaaaat cctgtttgat ggtgggttccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag 15300  
aatagcccgat gatagggttg agtgttggtc cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga 15360  
acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg 15420  
aaccatcacc caaatcaagt tttttggggg cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc 15480  
ctaaaggag ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg 15540  
aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga 15600  
tcggtgcggg cctcttoget attacccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga 15660  
taagtggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtga 15720  
tcgagctcg gtaccggg 15739

<210> 5

<211> 11611

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Vector

<400> 5

agcttgcatt cctgcaggct gagggtgat gtggagtggt cgttacaca gtacacgagg 60  
acttctagct agaaagaagg attacctcta acaagtgt cctgtgcatt ctgggtaaac 120



gactcatagg agagttgtaa aaaagtttcg gccggcgat tgggtgttac ggagcattca 180  
ctaggcaacc atgcatgggt actattgtat accatcttag taggaantga tttcgagggt 240  
tatacctacg atgaatgtgt gtcctgtagg cttgagaggt caaggaagaa acatgcaatt 300  
atcttttgca acccagngc tgggtgacgga attttcatag tcaagctatc agagtaaaga 360  
agaggagcat gtcaaagtac aattagagac aaatatatag tcgctggag ccaagagcgg 420  
attcctcagt ctctgtagtc tcttgacgac cgttgatctg cttgatctcg tctccgaaa 480  
atgaaaatag ctctgctaag ctattcttct cttcgccgga gcctgnaagg cgttactagg 540  
ttgcagtcaa tgcattaatg cattgcagat gagctgtatc tggagaggt aaacccgaaa 600  
acgcgtttta ttcttggtga catggagcta ttaaactact agaaggcact ctttgctgct 660  
tggacaaatg aacgtatctt atcgagatcc tgaacacatc ttgtctcaac tccggagctg 720  
acatcgacac caacgatctt atatccagat tcgtcaagct gtttgatgat ttcagtaacg 780  
ttaagtggat cgatcccgcg gtcggcatct actctattcc tttgccctcg gacgagtgtc 840  
ggggcgctcg tttccactat cggcgagtac ttctacacag ccatcggtcc agacggccgc 900  
ttctgctg gctgattgtg tacgcccgc agtcccggt ccggatcgga cgattgctc 960  
gcatcgacc tgcgcccaag ctgcatcacc gaaattgccc tcaaccaagc tctgatagag 1020  
ttggtcaaga ccaatgcgga gcatatacgc cgggagccgc ggcgacctg caagctccgg 1080  
atgcctccgc tcgaagtagc gcgtctgctg ctccatacaa gccaacacg gcctccagaa 1140  
gaagatgttg gcgacctcgt attgggaatc cccgaacatc gcctcgctcc agtcaatgac 1200  
cgctgttatg cggccattgt ccgtcaggac attggtggag ccgaaatccg cgtgcacgag 1260  
gtgccggact tcggggcagt cctcgccca aagcatcagc tcacgagag cctgcgcgac 1320  
ggacgcactg acggtgtcgt ccatcacagt ttgccagtga tacacatggg gatcagcaat 1380  
cgcgcatatg aaatcacgcc atgtagtgtg ttgaccgatt ccttgcggtc cgaatgggccc 1440  
gaacccgctc gtctggctaa gatcgccgc agcgatcgca tccatggcct ccgcgaccgg 1500  
ctgcagaaca gcgggcagtt cggtttcagg caggctctgc aacgtgacac cctgtgcacg 1560  
gcgggagatg caataggtca ggctctcgt gaattcccca atgtcaagca cttccggaat 1620  
cgggagcgcg gccgatgcaa agtgccgata aacataacga tctttgtaga aaccatcggc 1680  
cagctatctt acccgagga catatccacg ccctcctaca tcgaagctga aagcacgaga 1740  
ctttcgccc tccgagagct gcatcaggtc ggagacgctg tcgaactttt cgatcagaaa 1800  
cttctcgaca gacgtcgcg tgagttcagg catggtgatg tctgctcaag cggggtagct 1860  
gttagtcaag ctgcgatgaa gtgggaaagc tcgaactgaa aggttcaaag gaataagggg 1920  
tgggaaggat ggagtatgga ttagtcaaag tacttactta ggggaaataa aggttcttgg 1980  
atgggaagat gaataactg aagatgggaa aagaaagaga aaagaaaaga gcagctggtg 2040  
gggagagcag gaaaatatg caacaaatgt tggactgacg caacgacctt gtcaaccccg 2100  
ccgacacacc gggcgagcag acggggcaaa gctgcctacc agggactgag ggacctcagc 2160  
aggtegagt cagagcaccg gatgggtcga ctgccagctt gtgttcccgg tctgcgcgc 2220  
tggccagctc ctgagcggcc tttccggttt catacaccgg gcaaagcagg agaggcacga 2280  
tatttgagc ccctacagat gccggatggg ccaattaggg agcttacgcg ccgggtactc 2340  
gctctaccta cttcggagaa ggtactatct cgtgaatctt ttaccagatc ggaagcaatt 2400  
ggacttctgt acctaggtta atggcatgct atttcgccga cggctataca cccctggctt 2460  
cacattctcc ttcgcttact gccggtgatt cgatgaagct ccatattctc cgatgatgca 2520  
atagattctt ggtcaacgag gggcacacca gcctttccac ttcggggcgg aggggcggcc 2580



gggtcccgat taataatcat ccactgcacc tcagagccgc cagagctgtc tggccagtgg 2640  
cttattactc agcccttctc tctgcgtccg tccgtctctc cgcattgccag aaagagtcac 2700  
cgggtcactgt acagagctca cgagttcgtc acatttttct acaaattggtg gaggcggcgg 2760  
attttaggct caagtcattga ccctctgggt cactccagaa tcagctaggt caacgaataa 2820  
ggatgattct ataggaagat ccaggcaccg gtcaaccatg atctggacag atttgggagc 2880  
tcggtataag ctctccacct atcttattct gtatagttta ggcttaaagt ttatccagga 2940  
gatgttgctg aagtcgattt gaggccactt cctcactggg agctatacga ctttgatggg 3000  
cggtgtaggg gctgtattag gtctcgatca aacacaaata gaattaaatg gtactcgagt 3060  
ccactgaagg tggcttctcc gtcttccgta gccgtgccga aatccttaca gcttgtgttg 3120  
tgtgactttt gggtacgccg tctgactttt gtgggtgagct aactagagat catgctatat 3180  
ctcctgattt aatacaatgc tcatcataac attccacctg gaactgctag caacgtttga 3240  
cttgcatgtt gcaacgccct ttgcagagct atcggatgat caatagtgcc acgttctaaa 3300  
ttcaaccaac gcagggtgcc caagccttcg acatccggat gtatttcgaa aacctcatgg 3360  
gattgcagt cctcagattc atgttcattc caatgctcat tgggtgaataa aagggtcaca 3420  
gggaataagt tcaaactcga gatacttgag aatattgaaa gccaaaggac cctctatgct 3480  
ccaagctaga gtctcagcct ggaaagcaaa tccaaatgaa gctatgctac ctccaattcc 3540  
tcatcatctt atctataata cagagtcgaa gaatatctc ttgacaccgc tccgtcctcc 3600  
gacttcaata aggagcttac tctccttga caccaccctt ccagttcttc tcggcgttct 3660  
ggagggaggc cttgtcggtc ttgggctggc cctggctgag aaagctgttg gcagccttaa 3720  
agggagcgtg gaggtcacca gtgcgtgggt tcccgaagac gtggatctta accagattcg 3780  
aaagcgcctt cagcggatga tcgactggat cagaagagcg ttggtgtact tgaagtacag 3840  
atgcatgacg gccatcatgc caacgcccat gaactggctc ttaatgagct ggcggaactg 3900  
gcccttateg tactccatgt tggtagttgt gacaggacga ggctcctcgc cgcttccaag 3960  
cggagcaggc tcgacgtatt tcagtgtcga aagatctgat caagagacag gatgaggatc 4020  
gtttcgcatt attgaacaag atggattgca cgcaggttct cgggcgcgtt ggggtggagag 4080  
gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg 4140  
ctgtgcagcg caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa 4200  
gaactgcag gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacgggcg ttccttgccg 4260  
agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aagggaactg ctgctatttg gcgaagtgcc 4320  
ggggcaggat ctctgtcat ctcaccttgc tctgcccag aaagtatcca tcatggctga 4380  
tgcaatgcgg cggtgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa 4440  
acatcgcac gagcgcagc gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct 4500  
ggacgaagag catcaggggc tcgcgcacgc cgaactgttc gccaggctca aggcgcgat 4560  
gcccgcaggc gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggg 4620  
ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta 4680  
tcaggacata gcgttggtta cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga 4740  
ccgcttctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccgattcg cagcgcacg ccttctatcg 4800  
ccttcttgac gaggcttct gagcgggact ctgggggttc aaatgaccga ccaagcgacg 4860  
cccaacctgc catcacgaga ttctgattcc accgccgct tctatgaaag gttgggcttc 4920  
ggaatcggtt tccgggacgc cggttgatg atcctccagc gcggggatct catgctggag 4980  
ttcttcgcc acccggggt cgatccctc gcgagttggg tcagctgctg cctgaggctg 5040



gacgacctcg cggagttcta ccggcagtcg aaatccgtcg gcatccagga aaccagcagc 5100  
ggctatccgc gcatccatgc cccgaactg caggagtggg gaggcacgat ggccgctttg 5160  
gtccggatct ttgtgaagga accttacttc tgtggtgtga cataattgga caaactacct 5220  
acagagattt aaagctctaa ggtaaatata aaatttttaa gtgtataatg tgttaaacta 5280  
ctgattctaa ttgttttgtt atttttagatt ccaacctatg gaactgatga atgggagcag 5340  
tggtggaatg cctttaatga ggaaaacctg ttttgctcag aagaaatgcc atctagtgat 5400  
gatgaggcta ctgctgactc tcaacattct actcctccaa aaaagaagag aaaggtagaa 5460  
gaccccaagg actttccttc agaattgcta agttttttga gtcagtctgt gtttagtaat 5520  
agaactcttg cttgctttgc tatttacacc acaaaggaaa aagctgcact gctatacaag 5580  
aaaattatgg aaaaatattc tgtaaccttt ataagtaggc ataacagtta taatcataac 5640  
atactgtttt ttcttactcc acacaggcat agagtgtctg ctattaataa ctatgctcaa 5700  
aaattgtgta ccttttagctt tttaatttgt aaaggggtta ataaggaata tttgatgtat 5760  
agtgccttga ctagagatca taatcagcca taccacattt gtagagggtt tacttgcttt 5820  
aaaacctc ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttggtgt 5880  
aacttggtt attgcagctt ataatggta caaataaagc aatagcatca caaatttcac 5940  
aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc 6000  
ttatcatgtc tggatctgac gggctgcat gatcgtgctc ctgctggtga ggacccggct 6060  
aggctggcgg ggttgccctt ctggttagca gaatgaatca ccgatacgcg agcgaacgtg 6120  
aagcgactgc tgctgcaaaa cgtctgcgac ctgagcaaca acatgaatgg tcttcggttt 6180  
ccgtgtttcg taaagtctgg aaacgcggaa gtcagcgctc ttccgcttcc tcgctcactg 6240  
actcgtgctg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa 6300  
tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc 6360  
aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag 6420  
gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc 6480  
gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt 6540  
tccgaccctg ccgcttaccg gatactgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct 6600  
tctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg 6660  
tgtgtgcac gaaccccccg ttcagccga ccgctgcgc ttatccggta actatcgtct 6720  
tgagtccaac ccggtaaagc acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat 6780  
tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtctctg aagtgggtggc ctaactacgg 6840  
ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgtctgctg aagccagtta ccttcggaaa 6900  
aagagtgggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt 6960  
ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc 7020  
tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt 7080  
atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta 7140  
aagtatatat gagtaaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggacctat 7200  
ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg ttagataac 7260  
tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg 7320  
ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgagaag 7380  
tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tggtgccggg aagctagagt 7440  
aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttggttgc attgctgcag gcatcgtgg 7500



BASF AG  
BASF NAE 579/03

20/81

4. September 2003

gtcacgctcg tcgttttggt tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt 7560  
tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt 7620  
cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct 7680  
tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt 7740  
ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaacac gggataatac 7800  
cgcgccacat agcagaactt taaaagtgt catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa 7860  
actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa 7920  
ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca 7980  
aatgccgca aaaaaggga taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttct 8040  
ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga 8100  
atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc 8160  
tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag 8220  
gccctttcgt cttcaagaat tcgcggccgc aattaaccct cactaaagga tccctatagt 8280  
gtcgattt atgcggccgc gaattctcat gtttgaccgc ttatcatcga taagctctgc 8340  
ttttgttga cttccattgt tcattccacg gacaaaaaca gagaaaggaa acgacagagg 8400  
ccaaaaagct cgctttcagc acctgtcgtt tcctttcttt tcagagggta ttttaaataa 8460  
aaacattaag ttatgacgaa gaagaacgga aacgccttaa accggaaaat tttcataaat 8520  
agcgaaaacc cgcgaggtcg ccgcccgcgt acaaggcgga tcgccgga aa ggacccgcaa 8580  
atgataataa ttatcaattg catactatcg accgcaactgc tgccagataa caccaccggg 8640  
gaaacattcc atcatgatgg ccgtgcggac ataggaagcc agttcatcca tcgctttctt 8700  
gtctgctgcc atttgctttg tgacatccag cgccgcacat tcagcagcgt ttttcagcgc 8760  
gttttcgac aacgtttcaa tgttggtatc aacaccaggt ttaactttga acttatcggc 8820  
actgacgggt accttgctt gcgctggctc atcacgcagg ataccaaggc tgatgttgta 8880  
gatattggtc accggctgag ggttttcgat tgccgctgcy tggatagcac catttgcat 8940  
caggcngtcc ttgatgaatg aactccatt gcgaataagt tcgaaggaga cgggtgtcacg 9000  
aatgcgctgg tccagctcgg tcgattgctt tttgtgcagc agaggtatca atctcaacgc 9060  
gaaggctcat cgaagcgcaa tattgctgct caccaaaaacg cgtattgacc aggtgttcaa 9120  
ggcaaatct ctgccttct gatgtcagaa aggcaaagt attttctttc tggatttcag 9180  
ttgctgtgtg tcggtttcag caaaaccaag ctgcgcgaat tcggtgtgtc agatttagaa 9240  
ggcagatcac cagacagcaa cggccaacgg aaacagcgc atacagaaca tccgtcgccg 9300  
cgccgacaac gtgataattt ttatgacca tgatttattt ctttttagac gtgagcctgt 9360  
cgcacagcaa agccgcgaa agttcctcga agctagcttc agacgtgtct agatacgtct 9420  
gctttttgtt gacttccatt gttcattcca cggacaaaaa cagagaaagg aaacgacaga 9480  
ggccaaaag ctgcctttca gcacctgtc tttcctttct tttcagaggg tattttaaat 9540  
aaaaacatta agttatgacg aagaagaacg gaaacgcctt aaaccggaaa attttcataa 9600  
atagcgaaaa cccgcgaggt cgccgccccg taacaaggcg gatcgccgga aaggacccgc 9660  
aatgataat aattatcaat tgcatactat cgacggcact gctgccagat aacaccaccg 9720  
gggaaacatt ccatcatgat ggcgtgcyg acataggaag ccagttcatc catcgctttc 9780  
ttgtctgctg ccatttgctt tgtgacatcc agcgccgcac attcagcagc gtttttcagc 9840  
gcgttttcga tcaacgtttc aatgttggt tcaacaccag gtttaacttt gaacttatcg 9900  
gcactgacgg ttaccttgtt ctgcgctggc tcatcacgca ggataccaag gctgatgttg 9960



tagatattgg tcaccggctg aggggttttcg attgccgctg cgtggatagc accatttgcg 10020  
atcaggcngt ccttgatgaa tgacactcca ttgcaataa gttcgaagga gacgggtgtca 10080  
cgaatgcgct ggtccagctc ggtcgattgc cttttgtgca gcagaggtat caatctcaac 10140  
gccaaggctc atcgaagcgc aatattgctg ctcaccaaaa cgcgtattga ccagggtgttc 10200  
aacggcaaatt ttctgccctt ctgatgtcag aaaggcaaag tgattttctt tctgggtattc 10260  
agtigctgtg tgtcggtttc agcaaaacca agctcgcgca attcggctgt gcagatttag 10320  
aaggcagatc accagacagc aacggccaac ggaaaacagc gcatacagaa catccgtcgc 10380  
cgcgccgaca acgtgataat ttttatgacc catgatttat ttcttttag acgtgagcct 10440  
gtcgcacagc aaagccgccg aaagttcctc gaccgatgcc cttgagagcc ttoaaccag 10500  
tcagctcctt ceggtgggcg cggggcatga ctatcgctgc cgcacttatg actgtcttct 10560  
ttatcatgca actcgtagga cagggtgccg cagcgctctg ggtcattttc ggcgaggacc 10620  
gctttcgctg gagcgcgacg atgatcgccg tgtcgcttgc ggtattcgga atcttgacg 10680  
ccctcgctca agccttcgtc actgggtccc ccaccaaacg ttccggcgag aagcaggcca 10740  
atcgccgg catggcgcc gagcgcgtg gctacgtctt gctggcggtc gcgacgcgag 10800  
ctgggatggc ctccccatt atgattcttc tgccttcggc cggcatcggg atgcccgct 10860  
tgcaggccat gctgtccagg caggtagatg acgaccatca gggacagctt caaggatcgc 10920  
tcgcggctct taccagcta acttcgatca ttggaccgct gatcgtcacg gcgatttatg 10980  
ccgcctcggc gagcacatgg aacgggttgg catggattgt aggcgccgcc ctataccttg 11040  
tctgcctccc cgcgttgctg cgcggtgcat ggagccgggc cacctcgacc tgaatggaag 11100  
ccggcgccac ctgcgtaacg gattcaccac tccaagaatt ggagccaatc aattcttgcg 11160  
gagaactgtg aatgcgcaaa ccaacccttg gcagaacata tccatcgct cgcctatctc 11220  
cagcagccgc acgcggcgca tctcgggcag cgttggttcc tgcagatccg gctgtggaat 11280  
gtgtgtcagt tagggtgtgg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc 11340  
atgcatctca attagtcagc aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga 11400  
agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccggccct aactccgccc 11460  
atcccgcctc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt 11520  
ttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga 11580  
gcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa a 11611

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 6

gcngarggna thtgga



<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 7

tcngcnagra adatrtrtg

20

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 8

aagtgcacc gggtacacgc ttgtctt

27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 9

gcttatcacc atctgttacc tccttgc

27

<210> 10

<211> 2981

<212> DNA

<213> Blakeslea trispora



<400> 10

tctagaattc attccattcg aaaggatcaa cataaccaat ttaatgacta ctagctaattg	60
gatacaata tacgcacaaa aaaagaadaga attctatgat caaagagAAC acagacacag	120
agtgatacat ttaaattggtt aagttcttat gatgttaaaa tggtaactttt attattgaat	180
taaatgcgaa tatcgttgct gctttgtact tggaaaacgt taggtaaaag ttggttaattg	240
aaagaagcag gagttgtagt atcatctctt gggaagaaat agaaaaagag gaaagtaaca	300
gtaacaag caagacaata atagatccaa tggctttcgg tcttacgagt ttgttcagga	360
gcatacttct tttggctatc ttgtaacttt cttggtaagg gattctggcc aaagctttta	420
cagacttggc cggaagtaag cttacttcca gcaagaacga taggaacacc agtacctgga	480
tgtgtactac aaagaaaaga gaaatgagta cgtgcgttat taaaaaaaag aaaaaaagag	540
ggcaaaagta ttacctagct ccgacaaaga aaagattatc ataacggttt gtggaatcct	600
tggctactagg tctgaaccag agaacttgga acacatcatg agaaagacca agaatagaac	660
ctctccaaag gttaaacttg ctttgccaaa cactaggatc attcacttct tcatgttcaa	720
caaattagc aaagtgtgtt actcccaaac gacgttcgat aacttccaga accatcttgc	780
gtgcacgggt taccaactca ggataatttt cttcagcact gtttcctgtc ttactcttca	840
tatggccaat tggaaccaac acaataatgg agtccttggt gggaggtgcg gcagattcat	900
caattcgaga tggaacgttg acatagaatg aagcttcaga gggcaaaccg aagtcgttga	960
aaatctcatc aaaactttcc ttgtaggctt cagccaagaa gatattgtgt acgtctaatt	1020
gaggcacctt tgttgacatg gaccaataaa acgaaataga tgatgaagtg agtttctttg	1080
aggctaattg cttctttgtc caattgcaag gaggtaacag atggtgataa gcataaaca	1140



gatccgcatt acatacgact gcatcggcctt caatgacttc tccgctttcc aaagtgcacac	1200
cggttacacg cttgtcttta tcgacagtgt taatttttagc aacagggcat tgatatctga	1260
attcagcacc gtactttttg gaggcgatag actcaagctt ctgaacaacc atgttgaaac	1320
caccacgagg ataccagata ccttcagcaa actcgggtgta ttgtaacaaa ctgtaaactg	1380
ctggagcatc ataaggcgac atactatatt ccaaaaatag aaaatagaac aatgaatatc	1440
aaaattcctt tcacttgccc tttttcacat ttctcttttc ccacccccga ccggtctcac	1500
tcattttttt ttcatcccac accacgcgtt gtatgtgtac ttaccccata tacattgttt	1560
aaaagttaa agccatacgc attttcttgg ttggaaata ttactggct cggtcataga	1620
tcttaccaa caagtgcag cgaaagattt caggcacata ctgaagacga atcaaatccc	1680
aaatggtttc aaagttgcgc ttgatagcaa taaatgtacc ttgttcataa tggacatgtg	1740
tttccttcat gaaatccaag aatctaccaa atccaagggg accctcaata cggccaatt	1800
cgcccttcat cttgggttaa tcggaagaga gttgtacggc atcacgctcg tcaaaatgaa	1860
ccttatagtt attgtcacag cgaagcaaat ccaaagatc accaatacgt tcatccaaat	1920
agcaaatgc atcttcaaaa agcttaggca tcaaatagag tgaggggacc tgatcaaagc	1980
gatgaccatc gtgatgaatg aatgaacaac ggccaccgga aaagtcgttc ttttcaacaa	2040
cagtaactcg aaaaccttca cgagcaagac gagcagcagt agcagttccg ccaataccgg	2100
caccaatgac aacaatatgc ttcttttgat cagacatgag attaaaatag ataaggaaaa	2160
gaaagtgaaa agaaattcgg aagcatggca cattcttctt tttataaata catgcctgac	2220
tttctttttc catcgatatg atatatgcat atgatagata tacaagcaat cttcttcaag	2280
gagtttgaaa tttgtcctc caggagcaaa aaaaagtgtt tttttataca tgtttgata	2340
caagaatagt taccaatttg ctttggctctt acgtgctgca agtttatatc gttttcaatt	2400



BASF AG  
BASF NAE 579/03

25/81 4 September 2003

tctttgtctt tacattttct ttgtccttta tctttcctca tttagtcttt gggagaatta 2460  
ggaaaagggg ggggaaaggt aagaaatgct tgcgtatttt actaattcgg caaacatcca 2520  
atttggcaaa cagcagcctg tgcaacgctc tcgagatgac agtatctttg attacactct 2580  
aaatctcgat gacccgacca aaaagagcga acaagaaat aatcttgtgc attcgaatat 2640  
gatggaagat tttttccccc ttattctaaa tgttgacata gcgtgtatgt tatataaaca 2700  
aaaagaaatt gtacaaactt tcttttcttc tctttttatt ttatctctat gtcaatactc 2760  
ttatctgg aatttcatct ctactatata ctacctgtcc ttgcggcatt gtgttggtg 2820  
ctaaagccgt ttcactcaca gcaagacaat ctcaagtata aatttttaat gttgatggcc 2880  
gcctctaccg catcgatttg ggacaattat atcgtttatc atcgcgcttg gtggtactgt 2940  
cctacttgtg ttgtggctgt cattggctat gtacctctag a 2981

<210> 11

<211> 1749

<212> DNA

<213> Blakeslea trispora

<400> 11

atgtctgac aaaagaagca tattgttgtc attggtgccg gtattggcgg aactgctact 60  
gctgctcgtc ttgctcgtga aggttttcga gttactgttg ttgaaaagaa cgacttttcc 120  
ggaggccgtt gttcattcat tcatcacgat ggatcatcgt ttgatcaggg tccctcactc 180  
tatttgatgc ctaagctttt tgaagatgca tttgctgatt tggatgaacg tattggtgat 240  
catttgatt tgcttcgtg tgacaataac tataaggttc attttgacga cggatgatgcc 300  
gtacaactct cttccgattt aaccaagatg aagggcgaat tggaccgtat tgagggtccc 360



BASF AG  
BASF NAE 579/03

26/81 4 September 2003

cttggatttg gtagattctt ggatttcatg aaggaaacac atgtccatta tgaacaaggt 420  
acatttattg ctatcaagcg caactttgaa accatttggg atttgattcg tcttcagtat 480  
gtgcctgaaa tctttcgctt gcacttggtt ggtaagatct atgacdgagc cagtaaatat 540  
ttccaaacca agaaaatgcg tatggctttt acttttcaaa caatgtatat gggatatgtcg 600  
ccttatgatg ctccagcagt ttacagtttg ttacaataca ccgagtttgc tgaaggatc 660  
tggatatctc gtggtggtt caacatgggt gttcagaagc ttgagtctat cgcctccaaa 720  
gtacggtg ctgaattcag atatcaatcg cctgttgcta aaattaacac tgtcgataaa 780  
gacaagcgtg taaccggtgt cactttggaa agcggagaag tcattgaagc cgatgcagtc 840  
gtatgtaatg cggatcttgt ttatgcttat caccatctgt tacctccttg caattggaca 900  
aagaagacat tagcctcaaa gaaactcact tcatcatcta tttcgtttta ttggtccatg 960  
tcaacaaagg tgcctcaatt agacgtacac aatatcttct tggctgaagc ctacaaggaa 1020  
agttttgatg agattttcaa cgacttcggt ttgccctctg aagcttcatt ctatgtcaac 1080  
gttccatctc gaattgatga atctgccgca cctcccaaca aggactccat tattgtgttg 1140  
tccaattg gccatatgaa gagtaagaca ggaaacagtg ctgaagaaaa ttatcctgag 1200  
ttggtaaacc gtgcacgcaa gatggttctg gaagttatcg aacgtcggtt gggagtaaac 1260  
aactttgcta atttgattga acatgaagaa gtgaatgatc ctagtgtttg gcaaagcaag 1320  
tttaaccttt ggagagggtt tattcttggt ctttctcatg atgtgttcca agttctctgg 1380  
ttcagacctc gtaccaagga ttccacaaac cgttatgata atcttttctt tgtcggagct 1440  
agtacacatc caggtaactg tggttcctatc gttcttgctg gaagtaagct tacttccgac 1500  
caagtctgta aaagctttgg ccagaatccc ttaccaagaa agttacaaga tagccaaaag 1560



BASF AG  
BASF NAE 579/03

27/31 4 September 2003

aagtatgctc ctgaacaaac tcgtaagacc gaaagccatt ggatctatta ttgtcttgct 1620  
tggtactttg ttactttcct ctttttctat ttcttccaa gagatgatac tacaactcct 1680  
gcttctttca ttaaccaact ttacctaac gttttccaag taaaagcag caacgatatt 1740  
cgcatTTAA 1749

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 12

agagagggat ccttaaagtc gaatatcggt gc 32

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 13

agagagggat ccatgtctga taaaagaag ca 32

<210> 14

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer



<400> 14

actttattgg atccttaa at gcgaatatcg ttgctgc

37

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 15

ttccaattg gccacatgaa gagtaagaca ggaaacag

38

<210> 16

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 16

cctgtcttac tcttcatgtg gccaatgga accaacac

38

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 17

ctattttaat catatgtctg atcaaaagaa gcatattg

38

<210> 18



<211> 1771

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (166)..(1151)

<223>

<400> 18

tcacgagct tgcacgcaag tcagcgcgcg caagtcaaca cctgccgggc cacagcctca 60

aataataaag agctcaagcg tttgtgcgcc tcgacgtggc cagtctgcac tgccttgaac 120

ccgcgagtcct cccgccgcac tgactgccat agcacagcta gacga atg cag cta gca 177

Met Gln Leu Ala

1

gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag 225

Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys

5 10 15 20

gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg 273

Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp

25 30 35

gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa gag tca gac gcg gcc cgc ccg 321

Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro

40 45 50

gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc 369

Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile

55 60 65

aca atg gcg cta cgt gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac 417

Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His

70 75 80



BASF AG  
BASF NAE 579/03

30/31 4 September 2003

gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg 465  
Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp  
85 90 95 100

ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc acg agc agc 513  
Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Thr Ser Ser  
105 110 115

ctg ctc gac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca 561  
Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr  
120 125 130

ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg 609  
y Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met  
135 140 145

aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg 657  
Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu  
150 155 160

tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac 705  
Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His  
165 170 175 180

cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga 753  
His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly  
185 190 195

aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg 801  
Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met  
200 205 210

tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag 849  
Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln  
215 220 225

ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg 897  
Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala  
230 235 240

ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc 945



Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro  
245 250 255 260

cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg 993  
His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met  
265 270 275

aac tgg tgg aag tgg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt 1041  
Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe  
280 285 290

ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc 1089  
Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro  
295 300 305

ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga 1137  
Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg  
310 315 320

ggc ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcca 1185  
Gly Leu Val Pro Ala  
325

gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc gctgctgccg 1245

gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg tttgtagctg 1305

gagcttgc cccatggatg aagctgtgta gtggtgcagg gagtacaccc acaggccaac 1365

acccttgcag gagatgtctt gcgtcgggag gagtgttggg cagtgtagat gctatgattg 1425

tatcttaatg ctgaagcctt taggggagcg acacttagtg ctgggcaggc aacgccctgc 1485

aaggtgcagg cacaagctag gctggacgag gactcgggtg caggcaggtg aagaggtgcg 1545

ggaggggtgt gccacaccca ctgggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tgtggcagtg 1605

agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gtttgagcag tctcacttat tctttgatat 1665

agatactggt caggcaggtc aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgctgc 1725



BASF AG  
BASF NAE 579/03

32/84 4 September 2003

80

ccctgcgctt atgaagctgt aacaataaag tgggtcaaaa aaaaaa

1771

<210> 19

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

100> 19

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala

1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val

20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp

35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp

50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala

65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp

85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser

100 105 110



BASF AG  
BASF NAE 579/03

33/81

4 September 2003

81

Gly Thr Ser Ser Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
145 150 155 160

Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
260 265 270



BASF AG  
BASF NAE 579/03

34/81 4 September 2003

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
325

<210> 20

<211> 1662

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<20>

<221> CDS

<222> (168)..(1130)

<223>

<400> 20

cggggcaact caagaaattc aacagctgca agcgcgcccc agcctcacag cgccaagtga 60

gctatcgacg tggttgtgag cgctcgacgt ggtccactga cgggcctgtg agcctctgcg 120



ctcgcgtcctc tgccaaatct cgcgtcgggg cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc 176  
Met His Val  
1

gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc 224  
Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser  
5 10 15

agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc 272  
Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser  
20 25 30 35

g tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct 320  
Leu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro  
40 45 50

cca gca tct gac gcc aag ggc atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc 368  
Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly  
55 60 65

acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttt caa atc agg cta ccg 416  
Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro  
70 75 80

aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa gcc aca gcc 464  
Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala  
85 90 95

cag ctt ttg ggc gga agc agc agc cta ctg cac atc gct gca gtc ttc 512  
Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe  
100 105 110 115

att gta ctt gag ttc ctg tac act ggt cta ttc atc acc aca cat gac 560  
Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp  
120 125 130

gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg cac agg cag ctc aat gat ctc 608  
Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu  
135 140 145



BASF AG  
BASF NAE 579/03

36/81

4 September 2003

26

ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac tac agc atg 656  
Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met  
150 155 160

ctg cat cgc aag cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg 704  
Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly  
165 170 175

aaa gac cct gac ttc cac aag gga aat ccc ggc ctt gtc ccc tgg ttc 752  
Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe  
180 185 190 195

gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg 800  
a Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu  
200 205 210

gca tgg tgg gca gtg gtg atg caa atg ctg ggg gcg ccc atg gca aat 848  
Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn  
215 220 225

ctc cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc 896  
Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu  
230 235 240

ttc tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca 944  
Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala  
245 250 255

gca ggc tct cag gtg atg gcc tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca 992  
Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala  
260 265 270 275

tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg 1040  
Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp  
280 285 290

gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc 1088  
Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys  
295 300 305

cgc cgc ctg tcc ggg cgt gcc ctg gtg cct gcc ttg gca tga 1130



BASF AG  
BASF NAE 579/03

37/81

4. September 2003

85

Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala

310

315

320

cctggtccct ccgctggtga cccagcgtct gcacaagagt gtcattgctac aggggtgctgc 1190

ggccagtggtc agcgcagtgct actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccactgagca 1250

ctgggcatgc cactgagcac tgggcgtgct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg 1310

ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg gggctctggca gtggctagga tggagtttga 1370

tgcattcagt agcgggtggcc aacgtcatgt ggatgggtgga agtgctgagg ggtttaggca 1430

cgggcattt gagagggcta agttataaat cgcattgctgc tcatgcgac atatctgcac 1490

acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atgggacact tgtattgggt tcgtgctatt 1550

gttttattca gcagcagtagc ttagtggagg tgagagcagg gtgggtgagag tggagtgagt 1610

gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct 1662

<210> 21

<211> 320

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 21

Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala

1

5

10

15

Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His

20

25

30



BASF AG  
BASF NAE 579/03

38/81

4. September 2003

f6

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala  
35 40 45

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr  
50 55 60

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
65 70 75 80

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
85 90 95

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
100 105 110

Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
115 120 125

Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu  
130 135 140

Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp  
145 150 155 160

Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly  
165 170 175

Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val  
180 185 190



BASF AG  
BASF NAE 579/03

39/81

4. September 2003

87

Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe  
195 200 205

Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro  
210 215 220

Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala  
225 230 235 240

Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro  
245 250 255

Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr  
260 265 270

Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp  
275 280 285

Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu  
290 295 300

Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
305 310 315 320

<210> 22

<211> 729

<212> DNA

<213> Agrobacterium aurantiacum



<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (729)

<223>

<400> 22

g agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg 48  
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
1 5 10 15

atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96  
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
20 25 30

gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca 144  
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala  
35 40 45

aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192  
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60

cat gac gcg atg cac ggg tcg gtg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat 240  
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 80

gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg 288  
Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc 336  
Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 110



BASF AG  
BASF NAE 579/03

41/81

4. September 2003

gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc 384  
Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
115 120 125

cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc 432  
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140

gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac 480  
Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc 528  
Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg 576  
Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190

gac cgc cac aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac ccc gtg tcg ctg 624  
Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

ctg acc tgc ttt cac ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac 672  
Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac 720  
Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
225 230 235 240

acc gca tga 729  
Thr Ala

<210> 23

<211> 242



BASF AG  
BASF NAE 579/03

42784

4. September 2003

9c

<212> PRT

<213> Agrobacterium aurantiacum

<400> 23

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
1 5 10 15

Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
20 25 30

Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala  
35 40 45

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro



130

135

140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
225 230 235 240

r Ala

<210> 24

<211> 1631

<212> DNA

<213> Alcaligenes sp.



<220>

<221> CDS

<222> (99) .. (827)

<223>

<400> 24

ctgcaggccg ggcccgggtgg ccaatggtcg caaccggcag gactggaaca ggacggcggg 60

gggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag cct 116

Met Ser Gly Arg Lys Pro

1

5

ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctc ggt ctg acc gcc gcg atc 164

Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile

10

15

20

ctg ctg tgc tgg ctg gtc ctg cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat 212

Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp

25

30

35

ccg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc 260

Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Leu Ala Gly Leu Thr

40

45

50

tgg ctg tcg gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg 308

Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly

55

60

65

70

tcc gtg gtg ccg ggg cgg ccg cgc gcc aat gcg gcg atc ggg caa ctg 356

Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Ile Gly Gln Leu

75

80

85

gcg ctg tgg ctc tat gcg ggg ttc tcg tgg ccc aag ctg atc gcc aag 404

Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Pro Lys Leu Ile Ala Lys

90

95

100



BASF AG  
BASF NAE 579/03

45/84

4. September 2003

cac atg acg cat cac cgg cac gcc ggc acc gac aac gat ccc gat ttc 452  
His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asn Asp Pro Asp Phe  
105 110 115

ggt cac gga ggg ccc gtg cgc tgg tac ggc agc ttc gtc tcc acc tat 500  
Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly Ser Phe Val Ser Thr Tyr  
120 125 130

ttc ggc tgg cga gag gga ctg ctg cta ccg gtg atc gtc acc acc tat 548  
Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Thr Tyr  
135 140 145 150

ccg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tat gtc atc ttc tgg ccg gtc 596  
Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr Val Ile Phe Trp Pro Val  
155 160 165

ccg gcc gtt ctg gcg tcg atc cag att ttc gtc ttc gga act tgg ctg 644  
Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu  
170 175 180

ccc cac cgc ccg gga cat gac gat ttt ccc gac cgg cac aac gcg agg 692  
Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg  
185 190 195

tcg acc ggc atc ggc gac ccg ttg tca cta ctg acc tgc ttc cat ttc 740  
Thr Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe  
200 205 210

ggc ggc tat cac cac gaa cat cac ctg cat ccg cat gtg ccg tgg tgg 788  
Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His Pro His Val Pro Trp Trp  
215 220 225 230

cgc ctg cct cgt aca cgc aag acc gga ggc cgc gca tga cgcaattcct 837  
Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly Arg Ala  
235 240

cattgtcgtg ggcacagtcc tcgtgatgga gctgaccgcc tattccgtcc accgctggat 897

tatgcacggc cccctaggct ggggctggca caagtcccat cacgaagagc acgaccacgc 957



gttggaagaag aacgacctct acggcgctcgt cttcgcggtg ctggcgacga tcctcttcac 1017  
cgtgggcgcc tattggtggc cgggtgctgtg gtggatcgcc ctgggcatga cggctctatgg 1077  
gttgatctat ttcacacctgc acgacgggct tgtgcatcaa cgctggccgt ttcggtatat 1137  
tccgcggcgg ggctatttcc gcaggctcta ccaagctcat cgcctgcacc acgcggtcga 1197  
ggggcgggac cactgcgtca gtttcggctt catctatgcc ccacccgtgg acaagctgaa 1257  
gcaggatctg aagcggtcgg gtgtcctgcg cccccaggac gagcgccgt cgtgatctct 1317  
tcccggcg tggccgcatg aaatccgacg tgctgctggc aggggcccgc cttgccaacg 1377  
gactgatcgc gctggcgatc cgcaaggcgc ggcccgaact tcgcgtgctg ctgctggacc 1437  
gtgcggcggg cgccctcggac gggcatactt ggtcctgcca cgacaccgat ttggcgccgc 1497  
actggctgga ccgcctgaag ccgacaggc gtggcgactg gcccgatcag gaggtgcggt 1557  
tcccagacca ttgcggaagg ctccgggccg gatatggctc gatcgacggg cgggggctga 1617  
tgcgtagcgt gacc 1631

<210> 25

<211> 242

<212> PRT

<213> Alcaligenes sp.

<400> 25

Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu

1

5

10

15



BASF AG  
BASF NAE 579/03

47/81

4. September 2003

Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe  
20 25 30

Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu  
35 40 45

Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60

Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 80

Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 110

Asp Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly  
115 120 125

Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140

Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe  
165 170 175



BASF AG  
BASF NAE 579/03

43/81

4. September 2003

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro  
180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu  
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly  
225 230 235 240

Arg Ala

<210> 26

<211> 729

<212> DNA

<213> Paracoccus marcusii

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

<223>

<400> 26



BASF AG  
BASF NAE 579/03

49/81 4. September 2003

atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc aca agc	48
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu	
1                      5                      10                      15	
atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gca tgg ctg gcc ctg cat gtg cat	96
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His	
20                      25                      30	
gcg ctg tgg ttt ctg gac gcg gcg gcc cat ccc atc ctg gcg gtc gcg	144
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala	
35                      40                      45	
aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg	192
en Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala	
50                      55                      60	
cat gac gcg atg cac ggg tcg gtc gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat	240
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn	
65                      70                      75                      80	
gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg	288
Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp	
85                      90                      95	
cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc	336
Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr	
100                      105                      110	
gac gac gac cca gat ttc gac cat ggc ggc cdc gtc cgc tgg tac gcc	384
Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala	
115                      120                      125	
cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc	432
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro	
130                      135                      140	
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctg ggg gat cgc tgg atg tac	480
Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr	
145                      150                      155                      160	
gtg gtc ttc tgg ccg ttg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc	528



Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

gtg ttc ggc act tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg 576

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190

gac cgc cat aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac cct gtg tcg ctg 624

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

ctg acc tgc ttt cat ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac 672

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac 720

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
225 230 235 240

acc gca tga 729

Thr Ala

<210> 27

<211> 242

<212> PRT

<213> Paracoccus marcusii

<400> 27

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu

1 5 10 15

Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His

20

25

30



Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala  
35 40 45

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190



BASF AG  
BASF NAE 579/03

52/81

4. September 2003

100

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
225 230 235 240

Thr Ala

<210> 28

<211> 1629

<212> DNA

<213> Synechococcus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1629)

<223>

<400> 28

atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta  
Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu

48



BASF AG  
BASF NAE 579/03

53/81 4. September 2003

1	5	10	15	
gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta				96
Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu				
20	25	30		
gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg				144
Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met				
35	40	45		
ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac				192
Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His				
50	55	60		
gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag				240
Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln				
65	70	75	80	
tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg				288
Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly				
85	90	95		
ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt				336
Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys				
100	105	110		
gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat cgg caa				384
a His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln				
115	120	125		
ttt gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt				432
Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe				
130	135	140		
aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg				480
Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp				
145	150	155	160	
gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg				528
Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala				
165	170	175		



ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat 576  
Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn  
180 185 190

gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt 624  
Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys  
195 200 205

tcg gaa att ggc gct ccc cca tcc caa aag ggt agt agc tcc ggc atg 672  
Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met  
210 215 220

g atg gtg gcc atg cgg cat ttg gag gga att gcc aga cca aaa gga 720  
Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly  
225 230 235 240

ggc act gga gcc ctc aca gaa gcc ttg gtg aag tta gtg caa gcc caa 768  
Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln  
245 250 255

ggg gga aaa atc ctc act gac caa acc gtc aaa cgg gta ttg gtg gaa 816  
Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu  
260 265 270

aac aac cag gcg atc ggg gtg gag gta gct aac gga gaa cag tac cgg 864  
Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg  
275 280 285

gcc aaa aaa ggc gtg att tct aac atc gat gcc cgc cgt tta ttt ttg 912  
Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu  
290 295 300

caa ttg gtg gaa ccg ggg gcc cta gcc aag gtg aat caa aac cta ggg 960  
Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly  
305 310 315 320

gaa cga ctg gaa cgg cgc act gtg aac aat aac gaa gcc att tta aaa 1008  
Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys  
325 330 335



BASF AG  
BASF NAE 579/03

55/81

4. September 2003

atc gat tgt gcc ctc tcc ggt tta ccc cac ttc act gcc atg gcc ggg Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly 340 345 350	1056
ccg gag gat cta acg gga act att ttg att gcc gac tcg gta cgc cat Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His 355 360 365	1104
gtc gag gaa gcc cac gcc ctc att gcc ttg ggg caa att ccc gat gct Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala 370 375 380	1152
aat ccg tct tta tat ttg gat att ccc act gta ttg gac ccc acc atg n Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met 385 390 395 400	1200
gcc ccc cct ggg cag cac acc ctc tgg atc gaa ttt ttt gcc ccc tac Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr 405 410 415	1248
cgc atc gcc ggg ttg gaa ggg aca ggg tta atg gcc aca ggt tgg acc Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr 420 425 430	1296
gat gag tta aag gaa aaa gtg gcg gat cgg gtg att gat aaa tta acg Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr 435 440 445	1344
gac tat gcc cct aac cta aaa tct ctg atc att ggt cgc cga gtg gaa Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu 450 455 460	1392
agt ccc gcc gaa ctg gcc caa cgg ctg gga agt tac aac gcc aat gtc Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val 465 470 475 480	1440
tat cat ctg gat atg agt ttg gac caa atg atg ttc ctc cgg cct cta Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu 485 490 495	1488
ccg gaa att gcc aac tac caa acc ccc atc aaa aat ctt tac tta aca	1536



BASF AG  
BASF NAE 579/03

56/81

4. September 2003

10

Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr  
500 505 510

ggg gcg ggt acc cat ccc ggt ggc tcc ata tca ggt atg ccc ggt aga 1584  
Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg  
515 520 525

aat tgc gct cgg gtc ttt tta aaa caa caa cgt cgt ttt tgg taa 1629  
Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp  
530 535 540

<210> 29

<211> 542

<212> PRT

<213> Synechococcus sp.

<400> 29

Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
1 5 10 15

Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
20 25 30

Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met  
35 40 45

Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His  
50 55 60

Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln



BASF AG  
BASF NAE 579/03

57/81

4. September 2003

65

70

75

80

Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly

85

90

95

Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys

100

105

110

Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln

115

120

125

Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe

130

135

140

Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp

145

150

155

160

Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala

165

170

175

u Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn

180

185

190

Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys

195

200

205

Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met

210

215

220

Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly

225

230

235

240



Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln  
245 250 255

Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu  
260 265 270

Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg  
275 280 285

Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu  
290 295 300

Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly  
305 310 315 320

Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys  
325 330 335

Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly  
340 345 350

Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His  
355 360 365

Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala  
370 375 380

Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met  
385 390 395 400



BASF AG  
BASF NAE 579/03

59/81

4. September 2003

107

Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr  
405 410 415

Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr  
420 425 430

Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr  
435 440 445

Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu  
450 455 460

Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val  
465 470 475 480

Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu  
485 490 495

Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr  
500 505 510

Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg  
515 520 525

Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp  
530 535 540

<210> 30

<211> 776



<212> DNA

<213> Bradyrhizobium sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (774)

<223>

<400> 30

atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc 48

Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg

1 5 10 15

gac gat gcg agg cag cgc cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc 96

Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile

20 25 30

ctc gcc gcc tgg ctg gtg ctg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg 144

Phe Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro

35 40 45

ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg gtg ctg cag 192

Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln

50 55 60

acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac 240

Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His

65 70 75 80

ggc tcg ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag 288

Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln

85 90 95



BASF AG  
BASF NAE 579/03

61/81

4. September 2003

ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc 336  
Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val

100

105

110

gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc ggc acg gcc gag gat ccc gat 384  
Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp

115

120

125

ttc gac gag gtg cgc cgc cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt 432  
Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe

130

135

140

c ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc 480  
Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val

145

150

155

160

tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg 528  
Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu

165

170

175

ctg ttc tgg gcg ctg ccc ggg ctg ctg tcg gcg ctg cag ctg ttc acc 576  
Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr

180

185

190

tc ggc acc tat ctg cgc cac aag ccg gcc acg cag ccc ttc gcc gat 624  
Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp

195

200

205

cgc cac aac gcg cgg acg agc gaa ttt ccc gcg tgg ctg tcg ctg ctg 672  
Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu

210

215

220

acc tgc ttc cac ttc ggc ttt cat cac gag cat cat ctg cat ccc gat 720  
Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp

225

230

235

240

gcg ccg tgg tgg cgg ctg ccg gag atc aag cgg cgg gcc ctg gaa agg 768  
Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg

245

250

255



BASF AG  
BASF NAE 579/03

52/81

4. September 2003

110

cgt gac ta

776

Arg Asp

<210> 31

<211> 258

<212> PRT

<213> Bradyrhizobium sp.

<400> 31

Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg

1

5

10

15

Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile

20

25

30

Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro

35

40

45

Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln

50

55

60

Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His

65

70

75

80

Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln

85

90

95



111

Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val  
100 105 110

Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp  
115 120 125

Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe  
130 135 140

Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val  
15 150 155 160

Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu  
165 170 175

Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr  
180 185 190

Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp  
195 200 205

Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu  
210 215 220

Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp  
225 230 235 240

Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg  
245 250 255



Arg Asp

<210> 32

<211> 777

<212> DNA

<213> Nostoc sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 32

atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta 48

Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu

5

10

15

ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt 96

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe

20

25

30

att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta 144

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu

35

40

45

ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc 192

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala

50

55

60



atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat 240  
Met. Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
65 70 75 80

gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat 288  
Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
85 90 95

ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa 336  
Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys  
100 105 110

gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat 384  
p Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp  
115 120 125

tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg 432  
Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp  
130 135 140

tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga 480  
Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly  
145 150 155 160

tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa 528  
Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu  
165 170 175

aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta 576  
Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val  
180 185 190

caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt 624  
Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly  
195 200 205

ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt 672  
Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe  
210 215 220

tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac 720



BASF AG  
BASF NAE 579/03

66/81

4. September 2003

114

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
225 230 235 240

gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata 768  
Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
245 250 255

tct tta taa 777  
Ser Leu

<210> 33

<211> 258

<212> PRT

<213> Nostoc sp.

<400> 33

Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
20 25 30

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
35 40 45

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala  
50 55 60

Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His



BASF AG  
BASF NAE 579/03

67/81

4. September 2003

115

65

70

75

80

Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn

85

90

95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys

100

105

110

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp

115

120

125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp

130

135

140

Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly

145

150

155

160

Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu

165

170

175

Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val

180

185

190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly

195

200

205

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe

210

215

220

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His

225

230

235

240



Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
245 250 255

Ser Leu

<210> 34

<211> 789

<212> DNA

<213> Nostoc punctiforme

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

<400> 34

ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa 48  
Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
1 5 10 15

tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta 96  
Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
20 25 30

att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat 144  
Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn



MJ

35

40

45

tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa 192  
Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
50 55 60

atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat 240  
Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
65 70 75 80

ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca 288  
Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
85 90 95

cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag 336  
Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
100 105 110

aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat 384  
Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
115 120 125

ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc 432  
Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
130 135 140

atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta 480  
Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
145 150 155 160

ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc 528  
Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
165 170 175

tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat 576  
Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
180 185 190

ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat 624  
Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
195 200 205



ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc 672  
Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
210 215 220

gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat 720  
Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
225 230 235 240

gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac 768  
Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
245 250 255

t tca gta acc aat tcg taa 789  
Asn Ser Val Thr Asn Ser  
260

<210> 35

<211> 262

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<400> 35

Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
35 40 45



BASF AG  
BASF NAE 579/03

71/81

4. September 2003

119

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
50 55 60

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
65 70 75 80

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
85 90 95

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
100 105 110

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
130 135 140

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
145 150 155 160

Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
165 170 175

Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
195 200 205

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile



210

215

220

Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His

225

230

235

240

Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn

245

250

255

Asn Ser Val Thr Asn Ser

260

<210> 36

<211> 762

<212> DNA

<213> Nostoc punctiforme

<220>

<21> CDS

<222> (1)..(762)

<223>

<400> 36

gtg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca

48

Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro

1

5

10

15

gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc

96



Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
20 25 30

att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac 144  
Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Asp  
35 40 45

atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa 192  
Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
50 55 60

aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat 240  
Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
70 75 80

ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca 288  
Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
85 90 95

ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa 336  
Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
100 105 110

aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat 384  
Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp  
115 120 125

t cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt 432  
Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
130 135 140

atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att 480  
Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
145 150 155 160

tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act 528  
Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
165 170 175

tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tia ttc tat 576  
Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr



BASF AG  
BASF NAE 579/03

74/81

4. September 2003

122

180

185

190

ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag 624  
Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
195 200 205

cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc 672  
Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
210 215 220

acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat 720  
Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
225 230 235 240

att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag 762  
Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
245 250

<210> 37

<211> 253

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<400> 37

Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
1 5 10 15

Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
20 25 30

Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp  
35 40 45



BASF AG  
BASF NAE 579/03

75/81

4 September 2003

Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
50 55 60

Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
65 70 75 80

Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
85 90 95

Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
100 105 110

Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp  
115 120 125

Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
130 135 140

Leu Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
165 170 175

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
195 200 205



BASF AG  
BASF NAE 579/03

76/81

4. September 2003

124

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
210 215 220

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
245 250

<210> 38

<211> 1608

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (3) .. (971)

<223>

<400> 38

ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc

47

Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile

1

5

10

15

ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg

95



Gly	Pro	Pro	Pro	His	Leu	His	Arg	Ser	Phe	Ala	Ala	Thr	Thr	Met	Leu	
				20					25					30		
tcg	aag	ctg	cag	tca	atc	agc	gtc	aag	gcc	cgc	cgc	gtt	gaa	cta	gcc	143
Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Ser	Val	Lys	Ala	Arg	Arg	Val	Glu	Leu	Ala	
			35					40					45			
cgc	gac	atc	acg	cgg	ccc	aaa	gtc	tgc	ctg	cat	gct	cag	cgg	tgc	tcg	191
Arg	Asp	Ile	Thr	Arg	Pro	Lys	Val	Cys	Leu	His	Ala	Gln	Arg	Cys	Ser	
		50					55					60				
tta	gtt	cgg	ctg	cga	gtg	gca	gca	cca	cag	aca	gag	gag	gcg	ctg	gga	239
Leu	Val	Arg	Leu	Arg	Val	Ala	Ala	Pro	Gln	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu	Gly	
	65					70					75					
acc	gtg	cag	gct	gcc	ggc	gcg	ggc	gat	gag	cac	agc	gcc	gat	gta	gca	287
Thr	Val	Gln	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Asp	Glu	His	Ser	Ala	Asp	Val	Ala	
	80				85				90					95		
ctc	cag	cag	ctt	gac	cgg	gct	atc	gca	gag	cgt	cgt	gcc	cgg	cgc	aaa	335
Leu	Gln	Gln	Leu	Asp	Arg	Ala	Ile	Ala	Glu	Arg	Arg	Ala	Arg	Arg	Lys	
			100					105						110		
cgg	gag	cag	ctg	tca	tac	cag	gct	gcc	gcc	att	gca	gca	tca	att	ggc	383
Arg	Glu	Gln	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Ser	Ile	Gly	
			115					120					125			
tca	ggc	att	gcc	atc	ttc	gcc	acc	tac	ctg	aga	ttt	gcc	atg	cac		431
Val	Ser	Gly	Ile	Ala	Ile	Phe	Ala	Thr	Tyr	Leu	Arg	Phe	Ala	Met	His	
		130						135				140				
atg	acc	gtg	ggc	ggc	gca	gtg	cca	tgg	ggg	gaa	gtg	gct	ggc	act	ctc	479
Met	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Val	Pro	Trp	Gly	Glu	Val	Ala	Gly	Thr	Leu	
		145				150					155					
ctc	ttg	gtg	gtt	ggg	ggc	gcg	ctc	ggc	atg	gag	atg	tat	gcc	cgc	tat	527
Leu	Leu	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Met	Glu	Met	Tyr	Ala	Arg	Tyr	
	160				165				170					175		
gca	cac	aaa	gcc	atc	tgg	cat	gag	tcg	cct	ctg	ggc	tgg	ctg	ctg	cac	575
Ala	His	Lys	Ala	Ile	Trp	His	Glu	Ser	Pro	Leu	Gly	Trp	Leu	Leu	His	



BASF AG  
BASF NAE 579/03

78/81

4. September 2003

180	185	190	
aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg			623
Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu			
195	200	205	
ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc			671
Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly			
210	215	220	
ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg			719
Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu			
225	230	235	
ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg			767
Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu			
240	245	250	255
gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg			815
Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met			
260	265	270	
aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt			863
Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly			
275	280	285	
gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att			911
Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile			
290	295	300	
cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg			959
Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp			
305	310	315	
tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct gggtttcacac ctcatgcctg			1011
Ser Lys Arg			
320			
tgataagggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggtcg actggtctga			1071
tggccaatgg catcggccat gtctggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaaggtgatg			1131



BASF AG  
BASF NAE 579/03

79/81

4. September 2003

cacatcatca tgtgcggttg gaggggcttg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc 1191

caggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcggt tgtgaagcaa tgactccgcc 1251

catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta 1311

gtgcagcaaa ctatattcac ctagggtgtg tggtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg 1371

catgatgtac tcgtcatggt gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc 1431

agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga 1491

ggctcgtgcc agaaatggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga 1551

tgactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1608

<210> 39

<211> 322

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 39

Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly  
1 5 10 15

Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser  
20 25 30

Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg  
35 40 45



BASF AG  
BASF NAE 579/03

80/81

4. September 2003

Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu  
50 55 60

Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr  
65 70 75 80

Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu  
85 90 95

Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg  
100 105 110

Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val  
115 120 125

Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met  
130 135 140

Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu  
150 155 160

Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala  
165 170 175

His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys  
180 185 190

Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe  
195 200 205



BASF AG  
BASF NAE 579/03

81/81

4 September 2003

Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe  
210 215 220

Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly  
225 230 235 240

Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val  
245 250 255

Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys  
260 265 270

Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly  
275 280 285

Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro  
290 295 300

Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser  
310 315 320

Lys Arg